

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 03/03/2025.

WELLINGTON GOMES DE LIMA

Dinâmica metabólica de benzopiranos em *Peperomia obtusifolia* e seus endófitos *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum*

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química

Orientadora: Prof^a Dr^a Maysa Furlan

Araraquara

2023

L732d Lima, Wellington Gomes de
Dinâmica metabólica de benzopiranos em Peperomia obtusifolia e seus endófitos Diaporthe infecunda e Fusarium oxysporum / Wellington Gomes de Lima. -- Araraquara, 2023
109 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Maysa Furlan

1. Benzopiranos. 2. Fusarium oxysporum. 3. Fungos endofíticos. 4. Biossíntese. 5. Metabolômica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Dinâmica metabólica de benzopiranos em *Peperomia obtusifolia* e seus endófitos *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum*"

AUTOR: WELLINGTON GOMES DE LIMA

ORIENTADORA: MAYSIA FURLAN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Química, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSEMEIRE BRONDI ALVES (Participação Virtual)
Departamento de Química / Instituto de Ciências Exatas - UFMG - Belo Horizonte

Dr. EDUARDO HENRIQUE GUIMARÃES DA CRUZ (Participação Virtual)
Cimed Indústria Farmacêutica Ltda - CIMED - Pouso Alegre

Profa. Dra. SILVIA NOELI LÓPEZ (Participação Virtual)
Departamento de Farmacognosia / Universidad Nacional de Rosario - UNR - Argentina

Profa. Dra. LIDIANE GASPARETO FELIPPE (Participação Virtual)
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profª. Drª. ANDREIA DE ARAUJO MORANDIM GIANNETTI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Química / Fundação Educacional Inaciana Padre Sabóia de Medeiros - FEI - São Bernardo do Campo

Araraquara, 03 de março de 2023



Documento assinado digitalmente

ROSEMEIRE BRONDI ALVES
Data: 05/03/2023 10:08:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Wellington Gomes de Lima.

Nome em citações bibliográficas: LIMA, W. G.; LIMA, WELLINGTON, G. DE.

Nacionalidade: Brasileiro.

Naturalidade: Maceió – AL.

Estado civil: Solteiro.

Filiação

Nome do pai: Eustácio de Lima Oliveira.

Nome da mãe: Osmina Gomes de Lima.

Nascimento: 08 de dezembro de 1991.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: Química bacharelado.

Ano de conclusão: 2014.

Instituição: Universidade Estadual de Santa Cruz.

Mestrado: Química.

Ano de conclusão: 2017.

Instituição: Universidade Estadual de Santa Cruz.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo publicado em periódicos:

MARQUES, MARIA L. ; LUZARDO, FRANCISCO H. M. ; VELASCO, FERMIN G. ; GONZÁLEZ, LUIS NIETO ; SILVA, EVERTON J. DA ; LIMA, WELLINGTON G. DE . Compatibility of vegetable fibers with Portland cement and its relationship with the physical properties. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental (Online), v. 20, p. 466-472, 2016.

Resumos publicados em anais de congressos:

LIMA, W. G.; OLIVEIRA, R. A. ; BANDEIRA, M. L. S. F. ; LIMA, L. S. . Avaliação de solventes e misturas para a extração de compostos fenólicos em espécimes de *Eriope blanchetii*. In: 39ª Reunião anual da sociedade brasileira de química, 2016, Goiânia - GO. Anais da 39ª RASBQ, 2016.

LIMA, W. G.; OLIVEIRA, R. A. ; OLIVEIRA, F. F. . A DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONÓIDES, ANTOCIANINAS, COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM FARELO DE CACAU SUBMETIDO A PROCESSOS FERMENTATIVOS. In: I Simpósio de Ensino, Extensão, Inovação, Pesquisa e Pós-graduação e 20º Seminário de iniciação Científica - produção e transferência de conhecimento: diferentes olhares, 2014, Ilhéus. Acervo de Anais - Seminários de Iniciação Científica da UESC, 2014.

LIMA, W. G.; CRUZ, E. S. ; LUZARDO, F. H. M. ; VELASCO, F. L. C. G. . Determinação da compatibilidade de resíduos vegetais com cimento com fins construtivos. In: 19º Seminário de Iniciação Científica -Ética e Pesquisa, 2013, Ilhéus. Caderno de Resumos 2013- SIC- UESC, 2013.

CRUZ, E. S. ; LUZARDO, F. H. M. ; LIMA, W. G. ; VELASCO, F. L. C. G. . Estudo de formulações de composito de argamassa de cimento com adição de fibras de coco. In: 19º Seminário de Iniciação Científica -Ética e Pesquisa, 2013, Ilhéus. Caderno de Resumos 2013- SIC- UESC, 2013.

SANTOS, E. B. C ; AMADO, F. D. R ; OLIVEIRA, E. D. ; CARVALHO, C. R. S ; CAMPOS, J. T. A. ; LIMA, W. G. . Stress Analysis of vegetal fibers reinforced composites using for utilization in high added value civil engineering building materials.

In: XI Encontro do SBPMAT, 2012, Florianópolis. Anais do XI Encontro do SBPMAT. São Paulo, 2012. v. único.

Apresentações de trabalho:

LIMA, W. G.; OLIVEIRA, R. A. ; BANDEIRA, M. L. S. F. ; LIMA, L. S. . Avaliação de solventes e misturas para a extração de compostos fenólicos em espécimes de *Eriope blanchetii*. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

LIMA, W. G; OLIVEIRA, R. A. ; FRANCO, M. ; OLIVEIRA, F. F. . Determinação dos teores de flavonoides, antocianinas, compostos fenólicos e atividade antioxidante em farelo de cacau submetido a processos fermentativos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

LIMA, W. G.. Caracterização física de resíduos fibrosos de coco, baronesa, bananeira, cacau e casca de eucalipto e sua compatibilidade com cimento. 2013. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

LIMA, W. G.; LUZARDO, F. H. M. ; VELASCO, F. L. C. G. ; CRUZ, E. S. . Determinação da compatibilidade de resíduos vegetais com cimento com fins construtivos. 2013. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais que não mediram esforços para me ajudar nessa etapa tão importante da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maysa Furlan pela oportunidade em me aprofundar profissionalmente na área de pesquisa. Destaco a grande paciência, orientação, carinho, exemplo e confiança que tive durante toda a minha formação.

À Profa. Dra. Silvia N. López por ceder amostras fúngicas e a Profa. Dra. Andréia Morandim pelas grandes contribuições nos estudos de planejamento experimental e otimização de cultivo.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato e a Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi pela colaboração das análises de HPLC-ESI-QTOF-MS dos extratos de fungos.

Aos meus amigos profissionais Dr. João Bronzel, Dr. Flavio Politi e Dr. Alexandre Alves em que transcenderam em confiança, discussão de idéias, aprendizado e respeito por diversas vezes em momentos de dificuldades e superação no desenvolvimento da pesquisa.

À Profa. Dra. Isabele Rodrigues e a Profa. Dra. Lidiane Gasparetto pela troca de experiências e amizade.

Aos servidores técnicos Dr. Alberto C. Alécio, Dr. Nivaldo Borale e a Dra. Juliana pelo suporte e amizade durante todos esses anos.

Aos meus pais Eustácio de Lima Oliveira e Osminha Gomes de Lima pelo apoio em todos os momentos.

Ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP pela infraestrutura, suporte acadêmico e segurança.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, pelas experiências profissionais e amizades.

Aos membros da seção técnica de pós-graduação do Instituto de Química da UNESP pela competência, disponibilidade e apoio acadêmico.

Aos professores e colegas do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) pela oportunidade de experiência científica e pelos grandes ensinamentos que adquiri com muito respeito e carinho.

À Erica Ribeiro pela companhia, muito amor, paciência, incentivo e carinho nos momentos importantes da minha vida.

Aos meus amigos de longa data Victor Aranha, Fabio Souza, Fabíola Morais, Amanda Oliveira e Vanessa Ramos pela motivação e carinho deles.

Aos amigos Rodolfo Debone, Victor Dasmasceno, Leonardo Bergamasco, Thiago Varão, Marcelo Nogueira, Alan Sakita, Ricardo Alexandrino, Roberth Trindade, Fabiola Sayao e Juliana Moreno em que tive a oportunidade de tê-los como apoio desde cheguei em Araraquara-SP.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil - (CAPES) – Código de financiamento 001.

Aos recursos técnicos de apoio de pesquisa ao NUBBE pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biodiversidade e Produtos Naturais (INCT-BioNat), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

EPÍGRAFE

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve
que renunciar para conseguir.”

(Dalai Lama)

RESUMO

A espécie *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) mostra o acúmulo de benzopiranos derivados do ácido orselínico, um policetídeo comumente encontrado em fungos. Estudos anteriores, com enfoque proteômico e transcriptômico, resultaram na identificação de proteínas envolvidas na rota biossintética de benzopiranos, incluindo tocoferol ciclase e preniltransferases. No entanto, as policetídeos sintases, possivelmente envolvidas na produção de um dos prováveis precursores, o ácido orselínico, um policetídeo comumente encontrado em fungos, não foram identificadas, sugerindo que o ácido orselínico pode ser produzido por endófitos intimamente associados a planta. Assim, os endófitos *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum*, foram isolados de *P. obtusifolia* e selecionados para os estudos de possível dinâmica metabólica entre planta-endófito, uma vez que análises prévias demonstraram a presença de policetídeos aromáticos. Os estudos para avaliação de perfil metabolômico foram baseados em técnicas hífenadas (UPLC-ESI-QTOF-MS e HPLC-ESI-QTOF-MS) e ferramentas de análise metabolômica, tais como UNIFI, *molecular networking*, pareamento de base de dados da plataforma GNPS e processamento MZmine dos espectros de MS no modo ESI(-) e ESI(+), para anotações dos policetídeos. Nesse caso, policetídeos aromáticos, incluindo, 1,3,6,8-tetraidroxi-naftaleno, bicaverina, islandicina, ácido astérico, antraquinonas, 6-metilsalicilato, ciperina, ácido lecanórico e zearalanóis foram anotados como derivados da via biossintética do ácido orselínico e estavam presentes nos extratos estudados de *F. oxysporum*, indicando que o ácido orselínico poderia, de forma heteróloga, se constituir no precursor da via de biossíntese dos cromanos em *P. obtusifolia*.

Palavras-chave: *Peperomia obtusifolia*; *Fusarium oxysporum*; *Diaporthe infecunda*; biossíntese; metaboloma; benzopiranos; ácido orselínico, policetídeos aromáticos.

ABSTRACT

The species *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) shows the accumulation of benzopyrans derived from orsellinic acid, a polyketide commonly found in fungi. Previous studies with a proteomic and transcriptomic focus resulted in the identification of proteins involved in the biosynthetic pathways of benzopyrans, including tocopherol cyclase and prenyltransferases. However, polyketide synthases, possibly involved in the biosynthesis of orsellinic acid, a polyketide commonly found in fungi, were not identified, suggesting that orsellinic acid may be produced by endophytes closely associated with the plant. Thus, the endophytes: *Diaporthe infecunda* and *Fusarium oxysporum* were isolated from *P. obtusifolia* and selected for the studies of possible metabolic dynamics between plant-endophyte, since previous analyzes showed the accumulation of aromatic polyketides. The studies for metabolomic profile evaluation were based on hyphenated techniques (UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC-ESI-QTOF-MS) and metabolomic analysis tools, such as UNIFI, molecular networking, GNPS platform database pairing. and MZmine processing of MS spectra in ESI(-) and ESI(+) mode for polyketide annotations. In such case, aromatic polyketides, including 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene, bikaverine, islandicin, asterric acid, anthraquinones, 6-methylsalicylate, cyperin, lecanoric acid and zearalanols were annotated as derivatives of the orsellinic acid biosynthetic pathway that were present in the studied extracts of *F. oxysporum*. It indicating that orsellinic acid could, in a heterologous way, constitute the precursor of the chroman biosynthesis in *P. obtusifolia*.

Keywords: *Peperomia obtusifolia*; *Fusarium oxysporum*; *Diaporthe infecunda*; biosynthesis; metabolome; benzopyrans; orsellinic acid; aromatic polyketides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produtos Naturais bioativos relevantes na história do desenvolvimento de fármacos: a) plantas; b) fungos e bactérias; c) Substância (ND) obtida pela modificação estrutural de PN.....	22
Figura 2 - Rotas biossintéticas das principais classes de metabólitos secundários.....	25
Figura 3 - Metabólitos complexos isolados em fungos <i>Acremonium</i> sp, <i>Penicillium chrysogenum</i> e <i>griseoroseum</i> derivados das vias dos isoprenóides com as vias dos policetídeos (8) e dos alcalóides (9), e com a via dos policetídeos e via heteróloga* dos flavonóides (10)...	26
Figura 4 - Diversidade de terpenos provenientes de plantas e fungos a partir de blocos construtores DMAPP e IPP.....	27
Figura 5 - Principais vias biossintéticas dos isoprenóides em seres eucariotos de plantas e fungos. A = via do mevalonato comuns em plantas e fungos (citossol) das células. B = via do piruvato em células de plantas (plastídeo).	28
Figura 6 - Via dos ácidos graxos e policetídeos aromáticos. Rotas A→A'= via ácido graxo sintase (FASs), B→B' e C = via das policetídeos sintases (PKSs).....	29
Figura 7 - Arquitetura modular dos conjuntos de domínios enzimáticos da 6-deoxieritronolideo B sintase (DEBS) responsável pela biossíntese de eritromicina A (6).	31
Figura 8 - Construção de policetídeos não reduzidos, norantrona (21) e norpirona (22), e sua arquitetura enzimática não modular.	32
Figura 9 - Domínio cetosintase (KS) das PKSs do tipo III - biossíntese de narigenina.	33
Figura 10 - Diversidade química de policetídeos aromáticos encontrados em espécies de fungos.....	34
Figura 11 - Policetídeos aromáticos: ácido orselínico (via PKSs do tipo I), rubiginosina C (via PKS do tipo II), , ácido olivetólico e resveratrol, (via PKS do tipo III).	35
Figura 12 - Biossíntese de 6-hidroximeleina e dos policetídeos intermediários a partir das mesmas arquiteturas PKS TrA e TrB.	36
Figura 13 - Diversidade de substâncias acumuladas em <i>Peperomia obtusifolia</i>	39
Figura 14 - Rota de biossíntese de cromanos em <i>P. obtusifolia</i> a partir do intermediário ácido orselínico (28) via PKS do tipo I ou III.....	41
Figura 15 - Perfis BPCs no modo ESI-(+) dos extratos brutos avaliados de <i>P. obtusifolia</i> , <i>D. infecunda</i> e <i>F. oxysporum</i> e dos padrões de ácido orselínico e AC.....	59
Figura 16 - Perfis BPCs no modo ESI-(-) dos extratos brutos avaliados de <i>P. obtusifolia</i> , <i>D. infecunda</i> e <i>F. oxysporum</i> e dos padrões de ácido orselínico e AC.....	60
Figura 17 - Perfis BPCs nos modos DDA e MS ^E dos extratos <i>D. infecunda</i> (em azul) e do branco (vermelho) adquiridos por ESI-(-) e ESI-(+).	62

Figura 18 - Perfis BPCs nos modos DDA e MS ^E dos extratos <i>F. oxysporum</i> (em azul) e do branco (vermelho) adquiridos por ESI(-) e ESI(+).	63
Figura 19 - Redes de interações moleculares de <i>D. infecunda</i> representando os clusters formados no modo positivo (vermelho), no modo negativo (azul) e as substâncias identificadas.	64
Figura 20 - Redes de interações moleculares de <i>F. oxysporum</i> representando os clusters formados no modo positivo (vermelho), no modo negativo (azul) e as substâncias identificadas.	65
Figura 21 - Substâncias anotadas pelo UNIFI em <i>D. infecunda</i> e <i>F. oxysporum</i> .	67
Figura 22 - Perfis cromatográficos do tipo DDA do íon extraído <i>m/z</i> 151 no modo ESI(+) dos extratos de <i>D. infecunda</i> , <i>F. oxysporum</i> e padrão de ácido orselínico.	70
Figura 23 - Redes moleculares com anotação direcionada a detecção de policetídeos aromáticos similares. Clusters e nodos adquiridos a partir dos extratos de <i>F. oxysporum</i> (G1;G2) e padrão ácido orselínico (G3;G4). Os nodos vermelho e verde representam os grupos G1 e G3 com as anotações <i>m/z</i> no ESI(+) e os nodos azul e vermelho representam os grupos G2 e G4 no ESI(-).	71
Figura 24 - Representação em pizza de variação metabólica observada em porcentagem de superclasses de MSs para cada condição de cultivo de dias (d) e temperatura (°C). Processamento NAP e MOLNETENHANCER realizado na plataforma GNPS.	72
Figura 25 - Policetídeos aromáticos anotados pelo processamento de dados ESI(+) sob diferentes condições de cultivo de temperatura(°C) e dias(d).	74
Figura 26 - Policetídeos aromáticos anotados pelo processamento de dados ESI(+) sob diferentes condições de cultivo de temperatura(°C) e dias(d).	75
Figura 27 - Policetídeos aromáticos anotados pelo processamento de dados ESI(-) sob diferentes condições de cultivo de temperatura(°C) e dias(d).	76
Figura 28 - Policetídeos aromáticos anotados após processamento MZmine2 utilizando base de dados KEGG.	78
Figura 29 - Perfil LC-MS (BPC/XIC) de Ciperina anotado (<i>m/z</i> 261) de 32°C/9d condição de cultivo no modo ESI(+).	80
Figura 30 - Perfil LC-MS (BPC/XIC) do ácido 6-metilsalicílico anotado (<i>m/z</i> 151) de 22°C/9d condição de cultivo no modo ESI(-).	81
Figura 31 - Demonstrativo dos perfis das placas do cultivo de <i>F. oxysporum</i> variando os dias (d) e temperatura (°C) de cultivo.	82
Figura 32 - Gráfico demonstrando a quantidade de massa de extrato obtido por tempo e temperatura de cultivo de <i>F. oxysporum</i> .	83

Figura 33 - Efeitos das variáveis de temperatura e tempo no fator de resposta do teor de ácido orselínico: a) O gráfico de Pareto com a linha vertical corresponde a um nível de confiança de 95%; b) Superfície de resposta; e c) Área de resposta.	85
Figura 34 - Representação do valor ótimo das variáveis tempo e temperatura para para maximização do teor do ácido orselínico.	87
Figura 35 - Variação do perfil cromatográfico devido a variação do volume de injeção de 1, 5 e 10 μL com concentração fixa de 0,5 mg.mL^{-1} de <i>F. oxysporum</i> (condição otimizada).	89
Figura 36 - Variação do perfil cromatográfico devido a variação da concentração de 0,1; 0,5 e 1 mg.mL^{-1} com volume fixo de 5 μL de <i>F. oxysporum</i> (condição otimizada).	90
Figura 37 - Variação do perfil cromatográfico das amostras de extrato com fortificação e sem fortificação. Concentração inicial 100% de extrato otimizado de <i>F. oxysporum</i> (0,5 mg.mL^{-1}) e 85% de ácido orselínico ($327 \times 10^{-5} \text{mg.mL}^{-1}$) adicionados com injeção fixa de 10 μL por HPLC-DAD.	93
Figura 38 - a) Perfil cromatográfico de íon extraído m/z 167 do extrato de <i>F. oxysporu</i> ; b) Espectros MS/MS do padrão de ácido orselínico e do extrato de <i>F. oxysporum</i> (condição otimizada).	95
Figura 39 - Proposta de mecanismos de fragmentação do ácido orselínico no modo ESI(-) conforme os espectros MS/MS do íon m/z 167.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores utilizados como variáveis de entrada de tempo (X1) e de temperatura (X2).....	54
Tabela 2. Substâncias identificadas nas análises de redes moleculares, biblioteca GNPS e dados de massas já publicados dos metabolitos que mostram acúmulo nos gêneros <i>Diaporthe</i> e <i>Fusarium</i>	66
Tabela 3. Substâncias anotadas nos extratos avaliados de <i>D. infecunda</i> e de <i>F. oxysporum</i> pelo processamento do sistema UNIFI	68
Tabela 4 - Anotações de policetídeos aromáticos obtidas pelo processamento MZmine2 de espectros MS/MS no modo ESI(-) e ESI(-) na avaliação dos extratos de planejamento CCR de <i>F. oxysporum</i>	79
Tabela 5 - Teor de ácido orselínico de cada extrato de <i>F. oxysporum</i> obtido por condição de cultivo de tempo e temperatura.....	84
Tabela 6 - Variação da curva analítica, LD, LQ e linearidade do padrão de ácido orselínico mediante ao volume diferentes de injeções de 5 e 10.....	88
Tabela 7 - Avaliação das concentrações finais do extrato de cultivo otimizado de <i>Fusarium oxysporum</i> usando a curva $y = (-707,5 + 165,1) + 107(2 + 0,8)x$, injeção fixa de 5 μL e $n=3$	91
Tabela 8 - Percentual de recuperação de adição de 85% de volume de padrão ácido orselínico após fortificação do extrato ($n=3$) para avaliação do efeito de matriz em cultivo otimizado de <i>F. oxysporum</i>	92
Tabela 9 - Concentração de ácido orselínico e o teor obtido no extrato de cultivo otimizado de <i>F oxysporum</i> avaliado em 3 replicatas.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1,3,6,8-THN: 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno

2HHC: 2'-hidroxidiidrochalcona

8CRA: 8-C-raminosil apigenina

AC: ácido (E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxílico

ACN: acetonitrila

AcOEt: acetato de etila

ACP: proteína carregadora de unidade acil,

ACS: acorenil sintase

ADMMB: ácido (E)-3-(4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il)-2,4-dihidroxi-6-metil-5-(3-metilbut-2-en-1-il)benzóico.

AT: aciltransferase,

AT_L: AT específica que reconhece propionil-CoA.

BDA: batata dextrose ágar

BEAC: borneol(E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxilato

BIS: bisaboleno sintase

BN: bioativo natural

BPC: cromatograma de pico base

CHEBI: Chemical Entities of Biological Interest

Da: unidade de massa atômica unificada em Daltons

DBO: demanda bioquímica de oxigênio

DDA: aquisição dependente de dados

DEBS: 6-desoxieritronolideo B sintase

DH: desidratase

DIA: aquisição independente de dados

DMAPP: difosfato de dimetilalila

DMMB: (E)-2-(4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il)-5-metil-4-(3-metilbut-2-en-1-il)benzeno-1,3-diol

EFS: extração em fase sólida

ER: enoilredutase,

ESI: ionização por electrospray
ESI-MS: espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray
eV: eletrovolt
FAS: ácidos graxos sintases
FEAC: fencol(E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxilato;
FooDB: food database
FPP: difosfato de farnesila
g.L⁻¹ : grama por litro
g: unidade de massa em grama
G3P: gliceraldeído 3- fosfato
GGPP: difosfato de geranyl geranila
GLS: geranilinol sintase
GPP: difosfato de geranila
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
HRAZA: rubiginosina C sintase
IDI: pirofosfato de isopentenila delta isomerase
IPP: difosfato de isopentenila
IS: isopreno sintase
ISMR: isoswertisin-4'-metil-eter-2'' α -L-ramnosídeo
ISR : Isoswertisin-2'' α -L-ramnosídeo
KR: cetoreductase
KR₀: função KR desativada
KS: cetosintase
KV: kilovolt
L.h⁻¹: litro por hora
LCY: licopeno ciclase
LS: limoneno sintase
m/m: massa por massa
m/z: relação massa/carga
MeOH: metanol
MEP: 2-C-metileritritol-4-fosfato
mL.min⁻¹: mililitro por minuto
MM: massa molecular

MOLNETENHANCER: Fluxo de trabalho da plataforma GNPS que combina as variáveis de saída em redes moleculares

MPs: metabólitos primários

MS/MS: espectrometria de massas sequencial

MS: espectrometria de massas

MS^E: Aquisição de dados de MS/MS do tipo *all-in-one scan* ou aquisição elevada de dados de MS/MS

MSs: metabólitos secundários

MVA: mevalonato

NAP: network annotation propagation

ND: natural derivado

NPAAtlas: natural products atlas

OAC: ácido olivetólico ciclase

OS: orselino sintase

OSQS: oxidoesqualeno sintase

PA: afinidade protônica

PKS: policetídeo sintase

PKSA: PKS de *Aspergillus*

PN: produto natural

PS: penicepene sintase

Q-TOF: analisador do tipo quadrupolo-tempo de vôo

SIGEN: Sistema de genealogia

SpecMZ: razão massa e carga das substâncias acessadas na base de dados MZmine

SQS: esqualeno sintase

STS: estilbeno sintase

TE: tioesterase,

TerA: PKS não redutase de *Aspergillus*

TKS: tetracetídeo sintase

TrB: PKS TerA com domínios enzimáticos modificados

TS: talaronoide sintase

UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência

v/v: volume por volume

XIC: cromatograma de íons extraídos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Química dos Produtos Naturais	21
1.1.1. Via isoprênica	26
1.1.2. Vias biossintéticas dos policetídeos.....	29
1.2. <i>Peperomia obtusifolia</i>	37
1.2.1. Perfil metabolômico de <i>P. obtusifolia</i>	38
1.2.2. Ácido orselínico e a via biossintética dos cromanos de <i>P. obtusifolia</i>	40
1.3. Fungos endofíticos de <i>P. obtusifolia</i>	42
1.3.1. <i>Diaporthe infecunda</i>	43
1.3.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	43
1.4. Dinâmica metabólica	44
2. OBJETIVOS	46
2.1. Objetivo Geral.....	46
2.2. Objetivos Específicos	46
3. PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1. Obtenção das amostras	47
3.1.1. Material vegetal - <i>Peperomia obtusifolia</i>	47
3.1.2. Cepas fúngicas – <i>Diaporthe infecunda</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>	47
3.2. Obtenção dos extratos brutos.....	48
3.2.1. Extratos de <i>P. obtusifolia</i>	48
3.2.2. Extratos de <i>D. infecunda</i> e <i>F. oxysporum</i>	48
3.3. Tratamento dos extratos.....	48
3.3.1. <i>Clean-up</i> dos extratos.....	48
3.3.2. Pré-concentração dos constituintes polares dos extratos	49
3.4. Estudo metabolômico	49
3.4.1. Análise por HPLC-ESI-QTOF-MS.....	49
3.4.2. Análise por UPLC-ESI-QTOF-MS.....	50
3.4.2.1. Aquisição dependente e independente de dados de MS e de MS/MS.....	51
3.4.2.2. Molecular Networking e processamento de dados pelo GNPS	52
3.4.2.3. Processamento de dados pelo UNIFI	53
3.5. Avaliação da dinâmica metabólica.....	53
3.5.1. Planejamento experimental de cultivo fúngico	53
3.5.2. Processamento de dados e detecção de policetídeos aromáticos.....	54

3.5.3. Teor de ácido orselínico e otimização de cultivo fúngico	55
3.6. Método HPLC-DAD para quantificação de ácido orselínico	56
3.6.1. Curva de calibração, linearidade, limites de detecção e de quantificação.....	57
3.6.2. Precisão, efeito de matriz e fator de recuperação.....	58
3.6.3. Estabilidade de extrato	58
4. Resultados e discussões	59
4.1. Avaliação do perfis metabolômicos	59
4.1.1. Análise comparativa dos extratos por UPLC-ESI-QTOF-MS	59
4.1.2. Aquisição de dados de MS e de MS/MS nos modos DDA e MS ^E	61
4.1.3. Redes moleculares e processamento de dados GNPS	64
4.1.4. Anotações de MSs pelo UNIFI.....	67
4.1.5. Triagem dos fungos e a detecção de ácido orselínico	69
4.2. Avaliação da dinâmica metabólica de <i>F. oxysporum</i>	70
4.2.1. Anotação de policetídeos aromáticos empregando NAP e MolNethencencer.....	73
4.2.2. Anotação de policetídeos aromáticos pelo processamento MZmine2.....	77
4.3. Avaliação do teor de ácido orselínico em <i>F. oxysporum</i>	82
4.3.1. Delineamento experimental e otimização das variáveis de cultivo	82
4.3.2. Avaliação dos fatores de resposta e proposta de variáveis otimizadas.....	84
4.3.3. Condição otimizada para o cultivo de <i>F. oxysporum</i>	87
4.3.4. Avaliação do método HPLC-DAD e do extrato do cultivo otimizado.....	88
4.4. Estabilidade da solução de extrato	93
4.5. Detecção de ácido orselínico em solução de extrato de cultivo otimizado de <i>F. oxysporum</i> após de 24 hrs empregando UPLC-ESI-QTOF-MS	94
5. Conclusão.....	97
6. REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química dos Produtos Naturais

A descoberta de substâncias bioativas a partir de fontes naturais se configura em fundamental avanço de desenvolvimento de novos fármacos. Os produtos naturais (PNs) apresentam rica diversidade química e se configuram em modelos moleculares únicos, especialmente quanto ao grau de oxidação e complexidade estrutural, especialmente associada ao grande número de centros estereogênicos. Essa diversidade química está expressa em plantas, fungos, bactérias, insetos, organismos marinhos, líquens e algas. Até o momento, os estudos químicos de espécies vegetais expressam maior volume e, conseqüentemente, maior diversidade de metabólitos secundários (MSs). Dos PNs de planta avaliados do ponto de vista biológico, cerca de 20% apresentam atividade antitumoral e antimicrobiana. Dentre as substâncias conhecidas, incluem-se antitumorais, antimalárica e antimicrobiana, tais como taxol (**1**) (*Taxus brevifolia*) e vinblastina (**2**) (*Catharanthus roseus*), e como quinina (**3**) (*Cinchona spp.*) e artemisinina (**4**) (*Artemisia annua*) (Figura 1a) (ALTEMIMI et al., 2017; NEWMAN; CRAGG, 2020; THOMFORD et al., 2018).

Com o advento das descobertas científicas de Alexander Fleming e J. M. McGuire os PNs provenientes de fungos, leveduras e bactérias começaram a ser fortemente estudados a partir do ano 1930 e não parou mais. Denominados de bioativos naturais algumas substâncias impactaram e inovaram, dentre eles, dois antibióticos, a penicilinas (**5**) (*Penicillium notatum*) e a eritromicina A (**6**) (*Saccharopolyspora erythraea*) ganharam notoriedade (Figura 1b) (ABDEL-RAZEK et al., 2020; NEWMAN; CRAGG, 2020; SAYED et al., 2020).

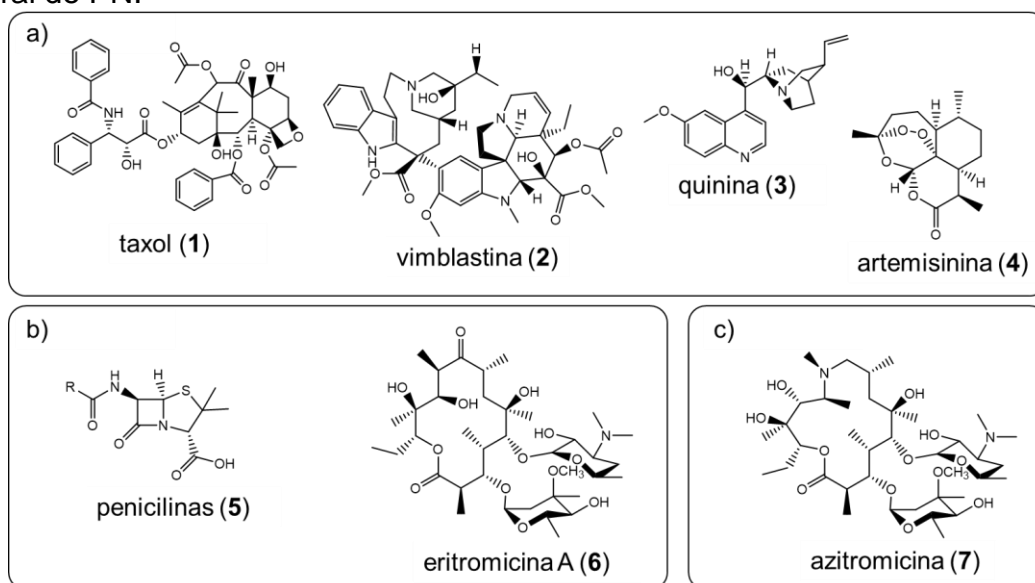
Com o avanço das técnicas de síntese orgânica, muitas dessas substâncias foram submetidas a síntese total e/ou semi-síntese visando inicialmente o aumento da produção em larga escala. Da mesma forma, modificações estruturais de substâncias naturais levaram a obtenção de derivados de produtos naturais (NDs), como a azitromicina (**7**), resultado de etapas de semi-síntese a partir da eritromicina A (**6**) (Figura 1b e c) (THOMFORD et al., 2018).

Nessa perspectiva, a identificação dos constituintes químicos de uma determinada matriz de PN se configura em uma etapa importante para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, pois possibilita vislumbrar as classes de substâncias produzidas e acumuladas *in natura*. Em pesquisas mais avançadas, as

aplicações de técnicas biotecnológicas e de engenharia genética, a utilização de sistemas heterólogos, especialmente na relação planta/microrganismo, trazem a possibilidade de obter, a partir de fontes heterólogas, eficientes e sustentáveis, metabólitos de interesse farmacológico (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Uma das aplicações da Biologia Sintética, reside na produção da artemisinina, uma importante droga com atividade antimalárica, cuja descoberta levou a cientista Youyou Tu, em conjunto com os cientistas William C. Campbell e Satoshi Ōmura, serem laureados com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina do ano de 2015 (SHEN, 2015). Originalmente encontrada em quantidades reduzidas na planta, *Artemisia annua*, a artemisinina pode ser biossintetizada em larga escala nos dias de hoje via expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* (BREITLING; TAKANO, 2015; PADDON; KEASLING, 2014).

Figura 1 - Produtos Naturais bioativos relevantes na história do desenvolvimento de fármacos: a) plantas; b) fungos e bactérias; c) Substância (ND) obtida pela modificação estrutural de PN.



Fonte: Autoria própria.

Assim, a identificação dos constituintes químicos (metabólitos) de uma determinada matriz de PN é a etapa mais importante em pesquisa de desenvolvimento de fármacos, pois possibilita vislumbrar quais são as classes de substâncias produzidas e acumuladas em uma determinada matriz natural. Em pesquisas mais avançadas que envolvem o “mapeamento” de rotas de biossíntese, as aplicações de técnicas biotecnológicas e de engenharia metabólica em plantas e microrganismos se

configuram em ferramentas inovadoras no desenvolvimento de fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020; THOMFORD et al., 2018).

Para isso, estudar as vias metabólicas dos seres vivos por meio de técnicas ômicas, tais como metabolômica, genômica e proteômica, permite adquirir informações adicionais mais abrangentes sobre os PNs, principalmente sobre os estudos da investigação biossintética (BORNSCHEUER et al., 2021). Vale lembrar, que todos os seres vivos possuem uma dinâmica metabólica complexa sendo que em muitos casos, mais de um ser vivo podem coexistir, como por exemplo a interação planta-microrganismo (NEWMAN; CRAGG, 2020). Além disso, os sistemas vivos são vulneráveis a situações de infecção ou estresse, fatores que afetam a dinâmica metabólica (COMPANT et al., 2019; THOMFORD et al., 2018; YAN et al., 2019).

Estima-se que mais de 300 mil plantas possuem um ou mais microrganismos vivendo harmoniosamente. Esses microrganismos são denominados de endófitos e constituídos de fungos, bactérias e/ou actinomicetos (COMPANT et al., 2019). Normalmente, as partes aéreas (folhas, flores, frutos e caules) tendem a ter colônias de fungos enquanto que nas raízes costumam ser predominantes em colônias de bactérias (COMPANT et al., 2019; CRAGG; NEWMAN, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Durante muito tempo acreditava-se erroneamente que microrganismos eram patógenos (MASI et al., 2018). Somente a partir dos primeiros relatos sobre endófitos em 1904, novas perspectivas foram abordadas e diferentes interesses emergiram, especialmente após os resultados que comprovaram a produção alternativa do taxol (**1**) por *Taxomyces andreanae*, um fungo endofítico de *Taxus brevifolia* (MASI et al., 2018; NEWMAN; CRAGG, 2020; THOMFORD et al., 2018). Isso porque o interesse pela biossíntese do taxol (**1**) surgiu como consequência de atividade antitumoral da molécula em que a descoberta da produção por fungos endófitos trouxe mais interesse ainda. Desde então, houve desenvolvimento de pesquisas em mapear a rota biossintética do taxol e os genes que codificam cada enzima envolvida nas etapas de formação deste metabólito, especialmente da taxadieno sintase, enzima chave na biossíntese dessa substância (**1**) (MASI et al., 2018).

Assim, o estudo químico de PNs é importante para a elucidação de sistemas complexos de interação entre diferentes matrizes naturais e a investigação metabólica pode se configurar em uma etapa importante e complementar, associada as demais técnicas ômicas, na elucidação de vias biossintéticas que podem trazer luz às interações harmoniosas entre planta e microorganismo (LATA et al., 2018).

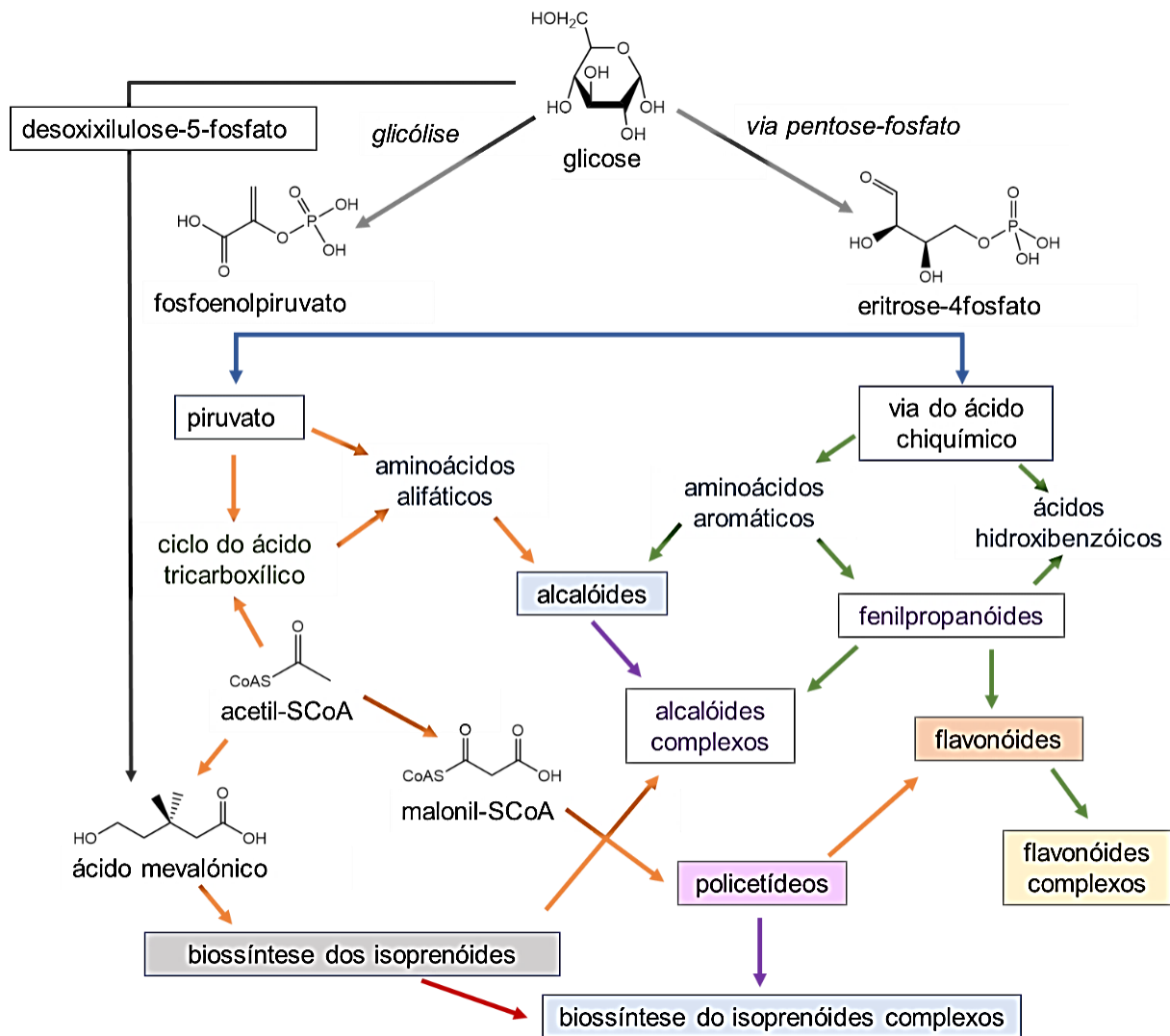
Os seres vivos desenvolvem processos bioquímicos complexos de produção e consumo de substâncias para atender as necessidades de crescimento, desenvolvimento, mecanismo de defesa e reparação (JAN et al., 2021). Essas substâncias são conhecidas como metabólitos primários (MPs) e MSs. Os MPs são produtos oriundos dos processos de respiração, fotossíntese e crescimento celular, como açúcares, aminoácidos e ácidos graxos. Por outro lado, a biossíntese dos MSs depende de vias primárias. (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Nas plantas e nos fungos, as vias glicolítica, desoxilulose-5-fosfato, pentose fosfato e o ciclo de Krebs são fundamentais para o fornecimento de intermediários biossintéticos de MSs (ISAH et al., 2018; JAN et al., 2021; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Conforme a figura 2, esses intermediários são conhecidos como blocos construtores e são oriundos dos processos de glicólise da via piruvato. Essa via participa de muitas outras rotas, principalmente na biossíntese dos ácidos tricarbóxicos, aminoácidos alifáticos, alcalóides, dentre outros (ISAH et al., 2018). Outras fontes de blocos construtores é a via desoxilulose-5-fosfato e da pentose fosfato (Figura 2), ambas responsáveis pelas rotas de biossíntese dos isoprenóides (rota do ácido mevalônico) em plantas e microrganismos, e dos MSs dependentes do ácido chiquímico em plantas, tais como os ácidos hidroxibenzóicos, aminoácidos aromáticos, alcalóides, fenilpropanóides e flavonóides (ISAH et al., 2018).

Por fim, o metabolismo do ciclo de krebs em plantas e microrganismos, principalmente em fungos, fornecem outros blocos construtores que são imprescindíveis: unidades acetil-CoA e malonil-CoA (Figura 2). Estas unidades quando ligadas com acetil coenzima A (CoA) estão envolvidas no ciclo do ácido tricarbóxico, a biossíntese dos policetídeos, e a via mevalônica (ISAH et al., 2018; MORISHITA et al., 2019).

Figura 2 – Rotas biossintéticas das principais classes de metabólitos secundários.



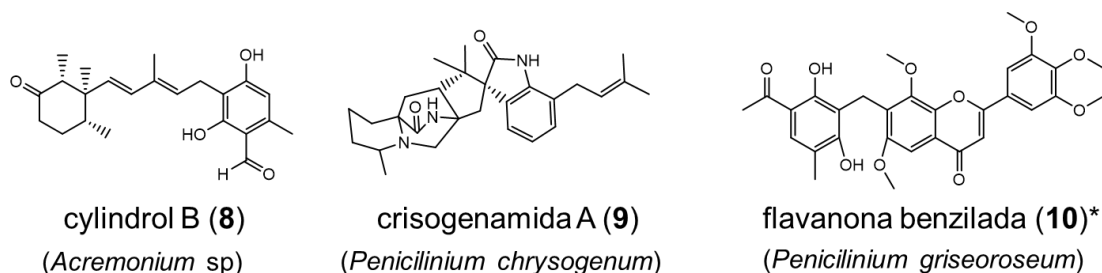
Fonte: Figura adaptada de Isah et al (2018).

Além das principais rotas mencionadas, diferentes vias podem convergir para formar outra variedade de MSs como isoprenóides, alcalóides e flavonóides (ISAH et al., 2018). Exemplos desses casos foram relatados em fungos, tais como *Acremonium* sp., *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium griseoroseum* que convergiram suas diferentes vias metabólicas com as vias biossintéticas da planta hospedeira (KLAS et al., 2018; RAN; LI, 2021; WANG et al., 2020a). Nesse contexto, o *Acremonium* sp é um exemplo de endófito que possui rotas genuínas dos isoprenóides e dos policetídeos, resultando em cilindrol B (8) (Figura 2, via dos isoprenóides complexos). Outro exemplo é a biossíntese dos alcalóides complexos em *P. chrysogenum* onde a via do piruvato e dos isoprenóides se convergem e resulta na biossíntese da crisogenamida A (9)

(Figuras 2 e 3). Por fim, tem-se o exemplo do *P. griseoroseum* que apresenta um caso de associação endofítica com sementes de *Coffea arabica* que converge a via do ácido chiquimico da planta com a via dos policetídeos do fungo resultando em “benzila flavanona (10)” (Figura 2, via dos flavonoides complexos). (KLAS et al., 2018; RAN; LI, 2021; WANG et al., 2020a).

Atualmente, as pesquisas sobre fungos endofíticos são mais exploradas do que outros tipos de microrganismos como bactérias endofíticas, considerando que boa parte dos MSs são explorados em partes aéreas de plantas e como já mencionado, colônias de fungos são mais comuns (COMPANT et al., 2019). Por isso, o estudo de vias biossintéticas em plantas e fungos associados ou isolados, juntamente com estudos genômicos e proteômicos auxiliam de forma significativa em pesquisas de desenvolvimento de microrganismos para produção bioativos, incluindo bactérias geneticamente modificadas com genes de plantas e/ou fungos (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019).

Figura 3 - Metabólitos complexos isolados em fungos *Acremonium* sp, *Penicillium chrysogenum* e *griseoroseum* derivados das vias dos isoprenóides com as vias dos policetídeos (8) e dos alcalóides (9), e com a via dos policetídeos e via heteróloga* dos flavonóides (10).



Fonte: Klas et al (2018), Ran e Li (2021) e Wang et al (2020).

Dessa forma, o isolamento de fungos e a compreensão sobre sua dinâmica metabólica de biossíntese de MSs acumulados em planta têm crescido no século XXI juntamente com o avanço da biotecnologia. (ROKAS et al., 2020).

1.1.1. Via isoprênica

Os isoprenóides são comuns em plantas e fungos (BORNSCHEUER et al., 2021) (WANG et al., 2020a). São formados pela condensação das unidades isoprênicas: difosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP). De

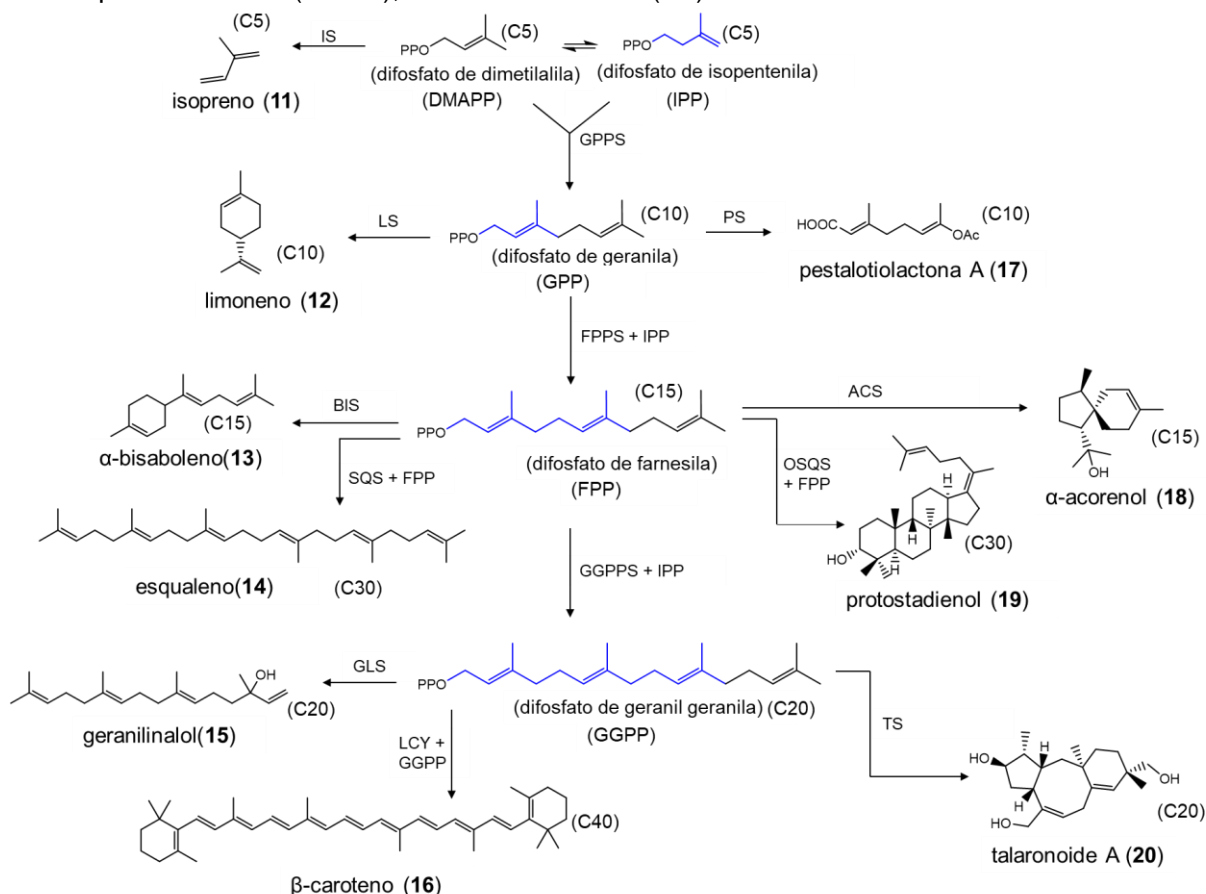
modo geral, as classes de substâncias derivadas da via isoprênica são classificadas em: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40), e politerpenos (> C45). (BORNSCHEUER et al., 2021; CHATZIVASILEIOU et al., 2019).

Como demonstrado na figura 4, as unidades de IPP e DMAPP são condensados para formar estruturas maiores através da adição sequencial de IPPs. O aumento da cadeia carbônica dos isoprenóides dependem inicialmente das enzimas: difosfato de geranila (GPP), difosfato de farnesila (FPP), difosfato de geranylgeranila (GGPP) e politerpenóides difosfatases (CROTEAU et al., 2011; KO et al., 2019).

Figura 4 - Diversidade de terpenos provenientes de plantas e fungos a partir de blocos construtores DMAPP e IPP.

Enzimas provenientes de plantas: isopreno sintase (IS); limoneno sintase (LS); bisaboleno sintase (BIS); esqualeno sintase (SQS); geranylinal sintase (GLS); licopeno ciclase (LCY).

Enzimas provenientes de fungos: penicepene sintase (PS); acorenol sintase (ACS); oxidoesqualeno sintase (OSQS); talaronoide sintase (TS).



Fonte: Figura adaptada de Ko et al (2019).

Sob essa perspectiva, a depender do organismo eucarioto, as unidades isoprênicas com número de carbono superior a 20 podem originar estruturas químicas complexas, incluindo os sesterterpenos, triterpenos e politerpenos, sendo catalisados

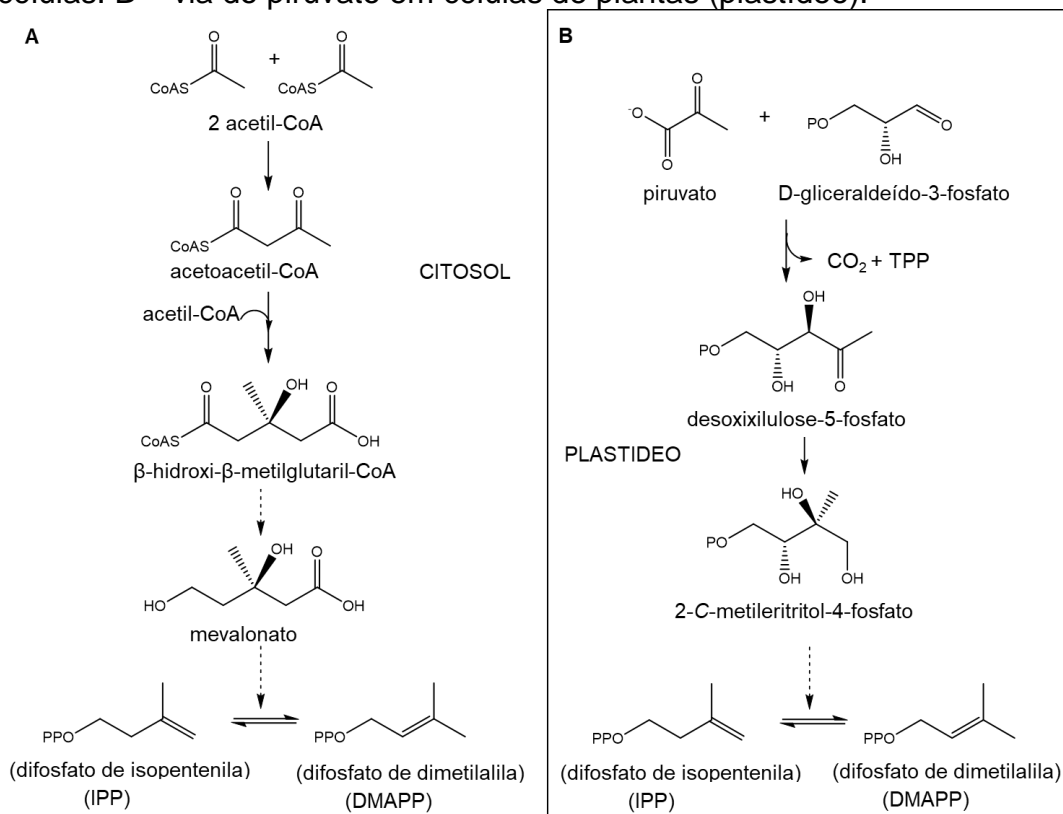
pelas respectivas terpeno sintases, ciclase e monoxigenase (BORNSCHEUER et al., 2021; CHATZIVASILEIOU et al., 2019).

Como já mencionado anteriormente, as unidades de DMAPP e IPP são importantes blocos construtores, e são produzidas por duas vias mais comuns conforme a figura 5 (A e B) (ISAH et al., 2018; PLAXTON, 1996).

A primeira via metabólica ocorre em plantas e fungos e descreve a via do mevalonato (MVA). No caso da segunda via, comum em plantas, corresponde a via do 2-C-metileritritol-4-fosfato (MEP).

Vale ressaltar que a via MEP acontece no plastídeo e envolve a condensação de quantidades equimolares de piruvato e gliceraldeído 3- fosfato (G3P). Em ambas vias o isômero DMAPP é produzido pela isomerização de IPP pela enzima difosfato de isopentenila delta isomerase (IDI) (ISAH et al., 2018; PLAXTON, 1996).

Figura 5 - Principais vias biossintéticas dos isoprenóides em seres eucariotos de plantas e fungos. A = via do mevalonato comuns em plantas e fungos (citossol) das células. B = via do piruvato em células de plantas (plastídeo).

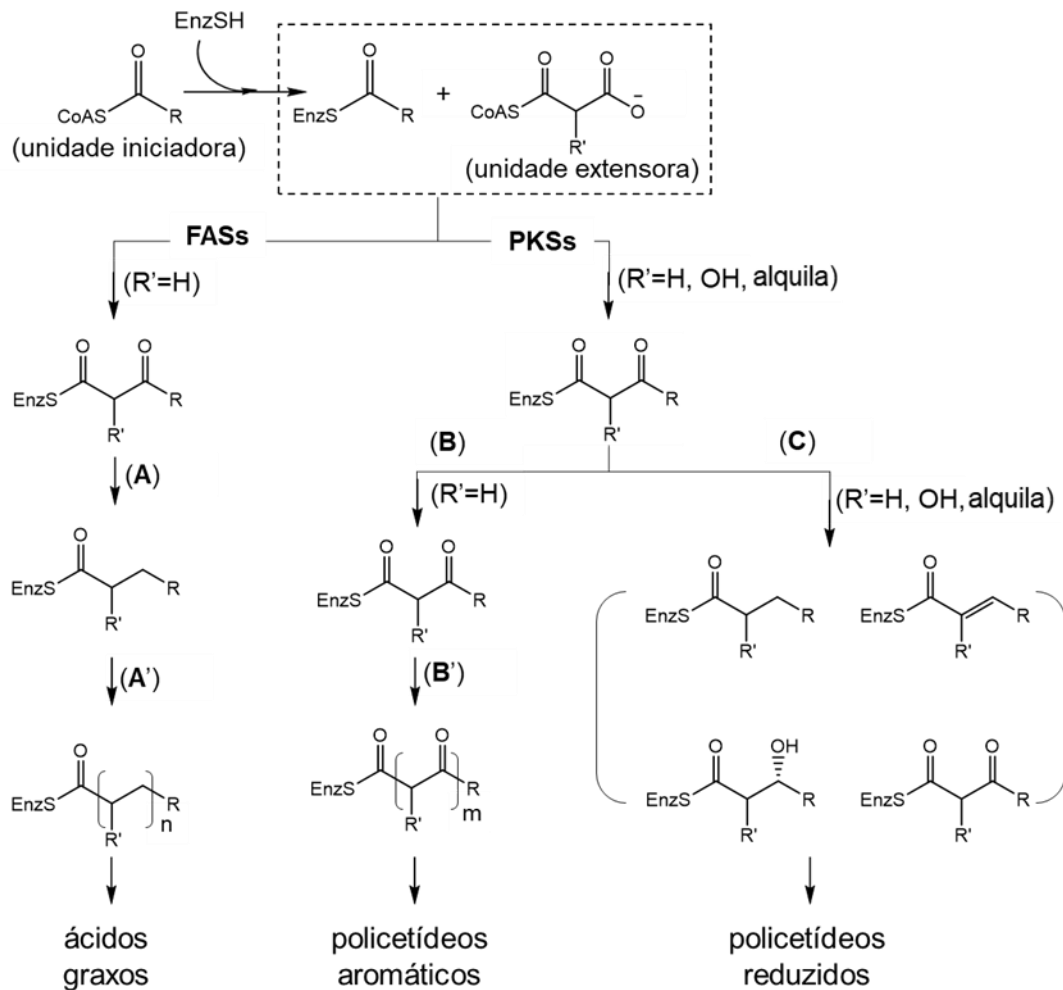


Fonte: Figura adaptada de Isa et al (2018) e Plaxton (1996).

1.1.2. Vias biossintéticas dos policetídeos

Os policetídeos são biossintetizados pela condensação dos blocos construtores, acetil-S-CoA (unidade iniciadora) e malonil-S-coA (unidade extensora) (CROTEAU et al., 2011) (Figura 6).

Figura 6 - Via dos ácidos graxos e policetídeos aromáticos. Rotas A→A' = via ácido graxo sintase (FASs), B→B' e C = via das policetídeos sintases (PKSs).



Fonte: Figura adaptada de Croteau et al (2011).

A via de biossíntese dos policetídeos aromáticos e reduzidos (Figura 6) dependem das arquiteturas enzimáticas das policetídeo sintases (PKSs) (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019). Do ponto de vista evolutivo das plantas e dos fungos, as PKSs surgiram a partir de mutações adaptativas das ácidos graxos sintases (FASs) (CRAWFORD; TOWNSEND, 2010).

Por alguma razão, as arquiteturas enzimáticas das FASs que eram responsáveis para formação da cadeia linear, foram desativadas devido os domínios enzimáticos alterarem para funções de oxidação e redução, originando assim as PKSs (BORNSCHEUER et al., 2021; COX, 2007)

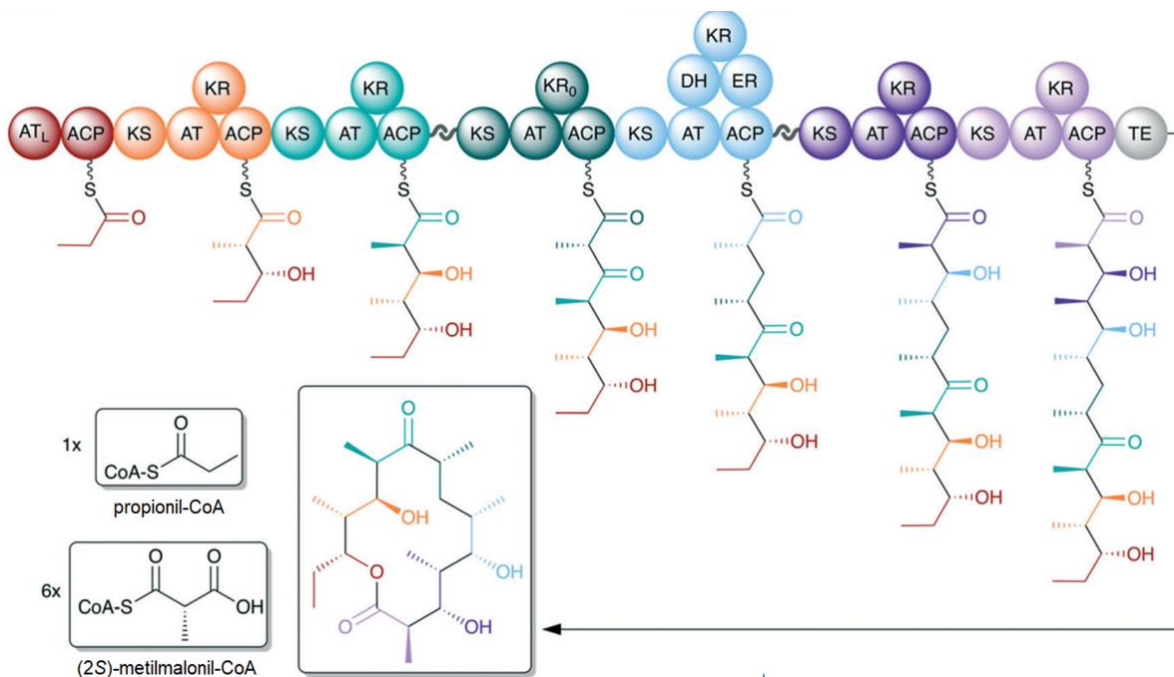
1.1.2.1. Arquitetura das PKSs

As PKSs são enzimas multifuncionais que condensam, oxidam, reduzem ou ciclizam as estruturas dos policetídeos. Essas enzimas possuem sítios catalíticos denominados de domínios que funcionam como “minifábricas” de moléculas (BORNSCHEUER et al., 2021). Cada domínio desempenha uma função enzimática e um conjunto desses domínios organizados constituem uma arquitetura construtora de um determinado policetídeo, como por exemplo 6-deoxieritronolideo B sintase (DEBS) (Figura 7) (BORNSCHEUER et al., 2021; KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019).

A eritromicina A (**6**) é um importante antimicrobiano da classe dos macrolídeos biossintetizado pela DEBS. A arquitetura enzimática dessa PKS é comum em bactérias do gênero *Saccharopolyspora* e em alguns fungos para síntese de policetídeos reduzidos. A sua principal característica é a organização multifuncional em módulos, ou seja, conjunto de domínios que desempenham pelo menos o aumento de cadeia extensora e mudança de estado de níveis de oxidação do C=O a C-OH ou C-H (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019).

No caso da construção do policetídeo **6** (Figura 7), que é um policetídeo reduzido, requer uma unidade de propionil-CoA (unidade iniciadora) incorporado na DEBS pelo arranjo dos domínios aciltransferase (AT) e proteína carregadora de unidade acila (ACP) e seis etapas de incorporação de unidades de (2S)-metilmalonil-CoA (unidades extensoras), envolvendo arranjos específicos de domínios ceto sintase (KS), ceto redutase (KR), desidratase (DH), enoilredutase (ER) e tioesterase (TE)(KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019).

Figura 7 - Arquitetura modular dos conjuntos de domínios enzimáticos da 6-deoxieritronolideo B sintase (DEBS) responsável pela biossíntese de eritromicina A (**6**). #Domínios enzimáticos: AT = aciltransferase, ACP = proteína carregadora de unidade acil, KS = cetosintase, KR = cetoreductase, DH = desidratase, ER = enoilredutase, TE = tioesterase, KR₀ = função KR desativada (não reduz grupo C=O a COH) e AT_L = AT específica que reconhece propionil-CoA.



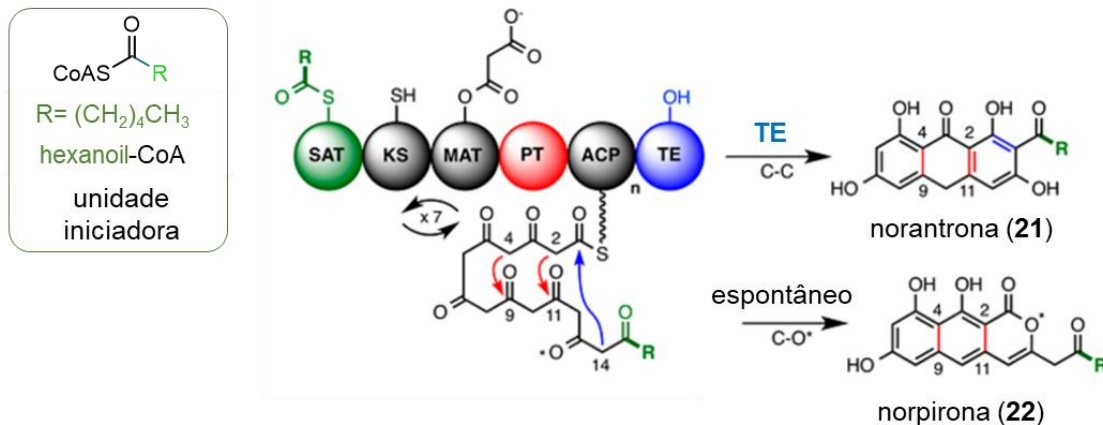
Fonte: Adaptado de Kornfuehrer e Eustáquio (2019).

Para os policetídeos aromáticos, a sua biossíntese mediada pelas PKSs possuem arquiteturas “não modulares”, na qual a construção do policetídeo depende exclusivamente do “domínio molde” PT (do inglês, product template) que é responsável pela conformação da estrutura química do policetídeo formado (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019).

Dessa forma, tendo como exemplo a arquitetura da PKS de *Aspergillus* (PKSA) (Figura 8) é observado a função do domínio PT para a formação dos anéis aromáticos juntamente com o domínio tioesterase (TE) para a formação catalisada de norantrona (**21**) ou pela inativação do TE, para formação espontânea de norpirona (**22**) em espécies de *Aspergillus* (Figura 8) (NEWMAN et al., 2014).

Figura 8 - Construção de policetídeos não reduzidos, norantrona (21) e norpirona (22), e sua arquitetura enzimática não modular.

#Domínios enzimáticos: SAT = aciltransferase de unidade iniciadora, MAT = aciltransferase da unidade extensora, ACP = proteína carregadora de unidade acil, PT = proteína “*template*” (molde) e TE = tioesterase.



Fonte: Adaptado de Newman et al (2014).

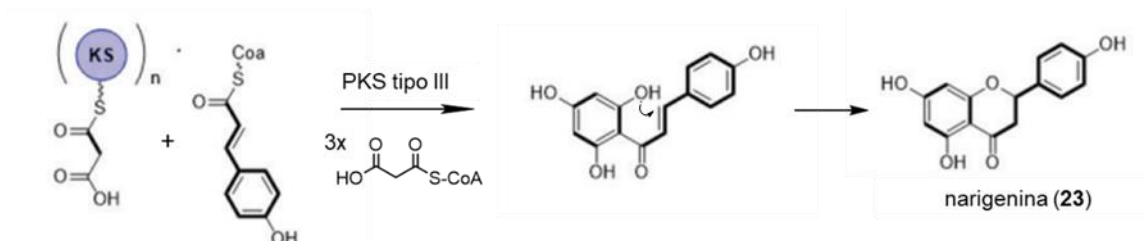
As PKSs modulares e não modulares possuem o domínio TE em suas arquiteturas, responsáveis pela formação de ésteres cíclicos ou aromatização de policetídeos (Figuras 7 e 8). A função desse domínio é a catálise de formação e liberação do policetídeo construído por dois caminhos: (A) formação de lactona pelo ataque nucleofílico intramolecular para a produção do macrocíclico correspondente, tal como ocorre para **6** (Figura 7) e **22** (Figura 8), ou (B) aromatização pelo ataque nucleofílico intermolecular, tal como ocorre para **21** (Figura 8) (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019; NEWMAN et al., 2014).

Existem uma infinidade de PKSs. São classificadas conforme o tipo de arquitetura que catalisam a formação de policetídeos reduzidos, aromáticos ou lineares. Elas são classificadas como tipo I, II ou III. As PKS tipo I são encontradas em bactérias e fungos, PKS tipo II são restritas a bactérias enquanto PKS tipo III são encontradas em plantas, bactérias e fungos (BORNSCHEUER et al., 2021; COX, 2007)

As PKSs do tipo I possuem um sistema iterativo de domínios organizados em um único módulo de modo que favorecem a construção de policetídeos conforme a quantidade de módulos (Figura 7). No caso das PKSs do tipo II, se configuram em um sistema iterativo de uma ou mais proteínas com funções multienzimáticas que possuem sítios ativos individuais organizados em um único módulo e participam da formação dos policetídeos reduzidos, lineares ou cíclicos, não necessariamente aromáticos (Figura 8). Por fim, as PKSs do tipo III não possuem domínios ACPs, o que diferem do tipo I e

II, além da ausência de domínio PT (Figura 9)(ADHIKARI et al., 2020; PAULO; SIGRIST; DE OLIVEIRA, 2019).

Figura 9 - Domínio cetosintase (KS) das PKSs do tipo III - biossíntese de narigenina.



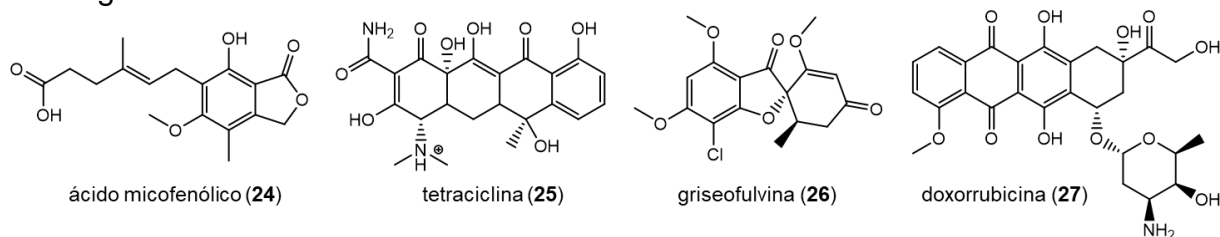
Fonte: Adaptado de Paulo, Sigrist e De Oliveira(2019).

Além disso, algumas particularidades são típicas para as PKSs do tipo III, sendo uma delas o reconhecimento abrangente de unidades iniciadoras ou extensoras diferentes de acetil-CoA e malonil-CoA (SHIMIZU; OGATA; GOTO, 2017). Muitas dessas arquiteturas proporcionam a construção de poliketídeo linear instável e suscetível às reações posteriores para formação de estruturas químicas aromáticas (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019). Exemplos dessas arquiteturas estão presentes em plantas, principalmente na biossíntese de flavonóides e chalconas, dentre elas a narigenina (**23**). (PAULO; SIGRIST; DE OLIVEIRA, 2019). Embora menos descrito, os fungos também são capazes de biossintetizar flavonóides quando cultivados em laboratórios, sob processos de biotransformação, ou seja metabolização do ácido benzóico envolvendo PKS do tipo III (BORNSCHEUER et al., 2021).

1.1.2.2. Biossíntese dos poliketídeos aromáticos

Os poliketídeos aromáticos são MSs diversos e são produzidos a partir de diferentes PKSs (FÄSEKE; RAPS; SPARR, 2020). Normalmente, são precursores de outros MSs e as estruturas químicas dos poliketídeos variam desde pelo menos um anel aromático (WANG et al., 2020b). Exemplos desses MSs são observados em metabolismos de fungos, tais como os poliketídeos: ácido micofenólico (**24**), tetraciclina (**25**), griseofulvina (**26**) e doxorrubicina (**27**) (Figura 10) que possuem atividades imunossupressoras, antibacterianas, antifúngicas e antitumorais (FÄSEKE; RAPS; SPARR, 2020; HALLE et al., 2019; WANG et al., 2020b).

Figura 10 - Diversidade química de policetídeos aromáticos encontrados em espécies de fungos.



Fonte: Adaptado de Halle et al (2019) e Wang et al (2020b).

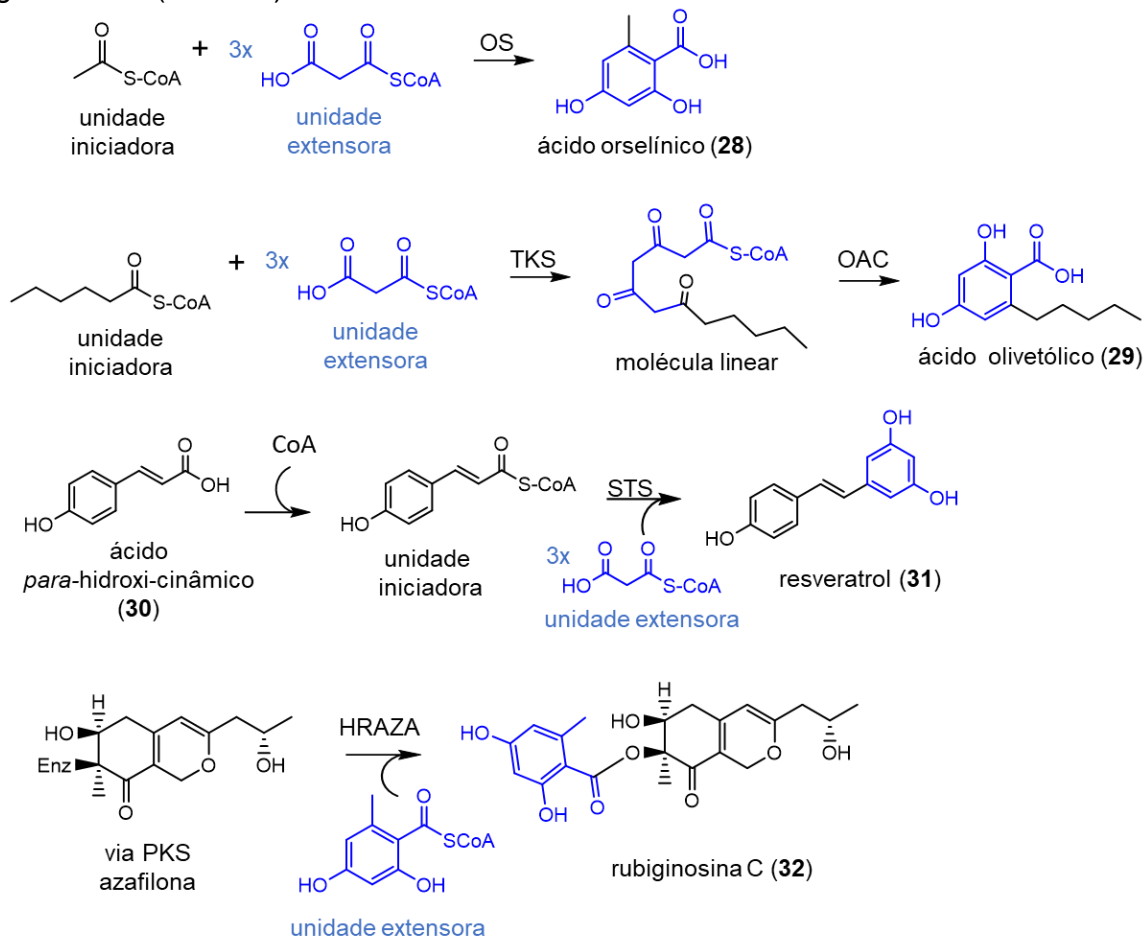
Em alguns casos, as PKSs do tipo III podem produzir derivados policetídeos oriundo de PKS do tipo I ou outras vias. Exemplos recaem sobre a biossíntese de resveratrol (**31**) e rubiginosina C (**32**), que ocorre a partir de precursores distintos, derivados ácidos *p*-hidroxibenzoicos (**28** e **30**) (Figura 11). Nesse caso, o ácido *para*-hidroxicinâmico (**30**) é o precursor do resveratrol (**31**) produzido pela ação da estilbeno sintase (STS) de planta, enquanto a rubiginosina C (**32**) provém do precursor azafilona de via PKS diferente, com a incorporação do ácido orselínico pela ruginosina C sintase (HRAZA) de fungo, que é uma PKS do tipo III, comum em espécies de fungo (ADHIKARI et al., 2020; BECKER et al., 2021).

De modo geral, a depender do tipo de PKS, os policetídeos aromáticos podem ser construídos a partir de unidades iniciadoras e extensoras específicas (Figura 11). Vale lembrar que para as PKS do tipo III, podem requerer outras enzimas não PKSs, tal como a ciclase/aromatase para a formação de policetídeos aromáticos (KAHLERT et al., 2021).

Tendo como exemplo a biossíntese do ácido orselínico (**28**) em fungos, o mesmo é produzido via arquitetura PKS do tipo I, mediada pela orselino sintase (OS), enquanto o ácido olivetólico (**29**) (Figura 11) em plantas e bactérias, é produzido pela ação do ácido olivetólico ciclase (OAC) após a formação de tetracetídeo pela tetracetídeo sintase (TKS) que é uma PKS do tipo III (KAHLERT et al., 2021; TAN; CHANG, 2018).

Figura 11 - Policetídeos aromáticos: ácido orselínico (via PKSs do tipo I), ruginosina C (via PKS do tipo II), , ácido olivetólico e resveratrol, (via PKS do tipo III).

Acetilcoenzima A (CoA); orselino sintase (OS); tetracetídeo sintase (TKS); ácido olivetólico ciclase (OAC); estilbeno sintase (STS); policetídeo sintase modular de ruginosina C (HRAZA).



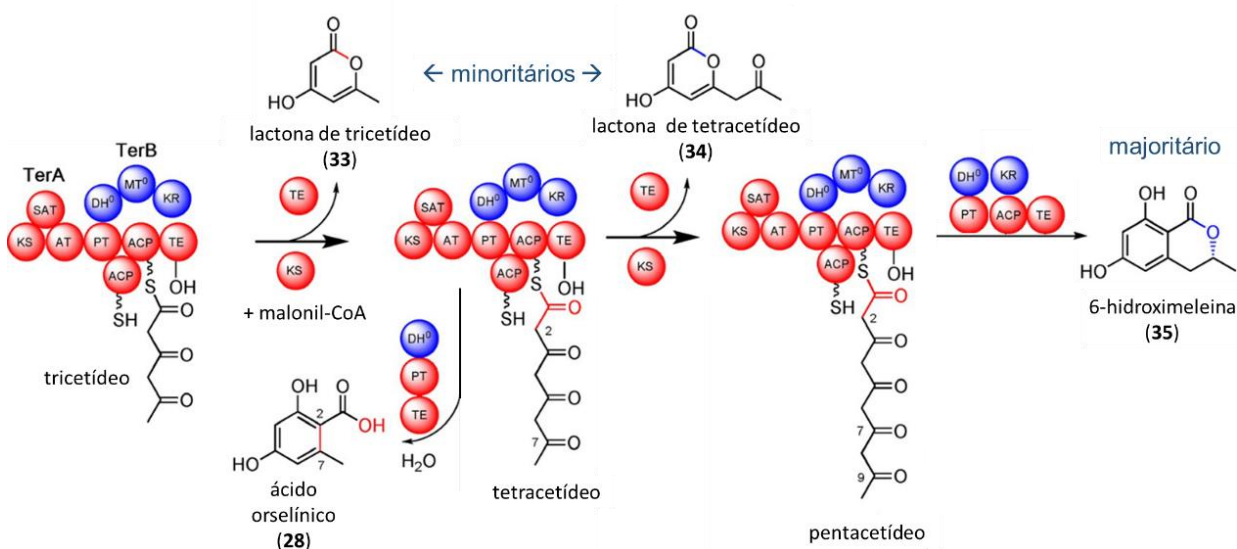
Fonte: Adaptado de Adhikari et al (2020) e Becker et al (2021).

Outra observação é a versatilidade das PKS, principalmente das PKS do tipo I, em relação à cinética de reação das PKSs, durante as etapas catalíticas de incorporações das unidades extensoras nas substituições nucleofílicas, principalmente entre os domínios AT, ACP e TE, em que as ligações C-S são formadas e desfeitas constantemente dentro da arquitetura de uma PKS (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019). Dessa forma, uma mesma arquitetura PKS favorece a construção de outros policetídeos em diferentes concentrações (KAHLERT et al., 2021).

Esse exemplo de “versatilidade” enzimática foi elucidada em estudos biossintéticos da 6-hidroximeleina (35) e seus intermediários em *Aspergillus niger* pela TerA (PKS não redutase) e TrB (PKS TerA com domínios modificados). Conforme demonstrado na figura 12, os domínios enzimáticos da TrA e TrB são responsáveis

pela construção de intermediários aromáticos, tal como ácido orselínico (**28**), e lactonas (**33**) e (**34**). Segundo os autores desse estudo, o domínio catalítico TE favoreceu a formação e liberação de **28** e **35** em maiores proporções, quando comparado as lactonas **33** e **34** devido a modificação favorável do domínio PT e suas novas interações com os demais domínios (KAHLERT et al., 2021).

Figura 12 - Biossíntese de 6-hidroximeleina e dos poliketídeos intermediários a partir das mesmas arquiteturas PKS TrA e TrB.



Fonte: Adaptado de Kahlert et al (2021).

1.2. *Peperomia obtusifolia*

A espécie *Peperomia obtusifolia* é herbácea e pertence a família Piperaceae, ordem Piperales. O genero *Peperomia*, juntamente com o gênero *Piper* são os mais representativos da subfamília Piperioideae. As espécies de *Peperomia* são nativas das regiões tropicais da América (BATISTA et al., 2017b; MOTA et al., 2011; TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998).

A *P. obtusifolia* é conhecida pelo seu vasto uso em ornamentações devido a sua beleza e fácil cultivo (GARCIA-CAPARRÓS et al., 2018; RUIZ MOSTACERO et al., 2019). As plântulas dessa espécie apresentam crescimento rápido em aglomerados de propagação em presença de luz e com nível moderado de umidade (ILYAS et al., 2014). Essa espécie possui folhagem verde oblonga e brilhante, caules curtos e fibrosos, facilmente quebradiços (GIBEAUT; THOMSON, 1989).

Além disso, existem inúmeras variações fenotípicas para essa mesma espécie, as quais são resultado de processos evolutivos diante de diferentes condições, sejam elas climáticas, nutricionais, de luminosidade e até mesmo de estresse (GARCIA-CAPARRÓS et al., 2018).

Nesse contexto, o metabolismo dessa espécie é dinâmico e complexo. Um exemplo, é a sua dinâmica metabólica na produção e no consumo de carboidratos, em que além dos processos de fotossíntese e de respiração, também possui o metabolismo ácido das crassuláceas durante a ausência de luz (BATISTA et al., 2017b).

Outro exemplo, é a produção de de MSs contendo padrões estruturais únicos, envolvidos em rotas biossintéticas diversas e pouco compreendidas. Desse modo, ainda há muito a ser estudado sobre a complexidade metabólica, especialmente as substâncias que pertencem às vias biossintéticas dos isoprenóides, do chiquimato e dos policetídeos aromáticos (BATISTA et al., 2017b; ILYAS et al., 2014; RUIZ MOSTACERO et al., 2019).

1.2.1. Perfil metabolômico de *P. obtusifolia*

Diversos estudos químicos de *P. obtusifolia* possibilitaram identificar e isolar diferentes classes de metabólitos secundários com importante papel biológico (Figura 13 a seguir).

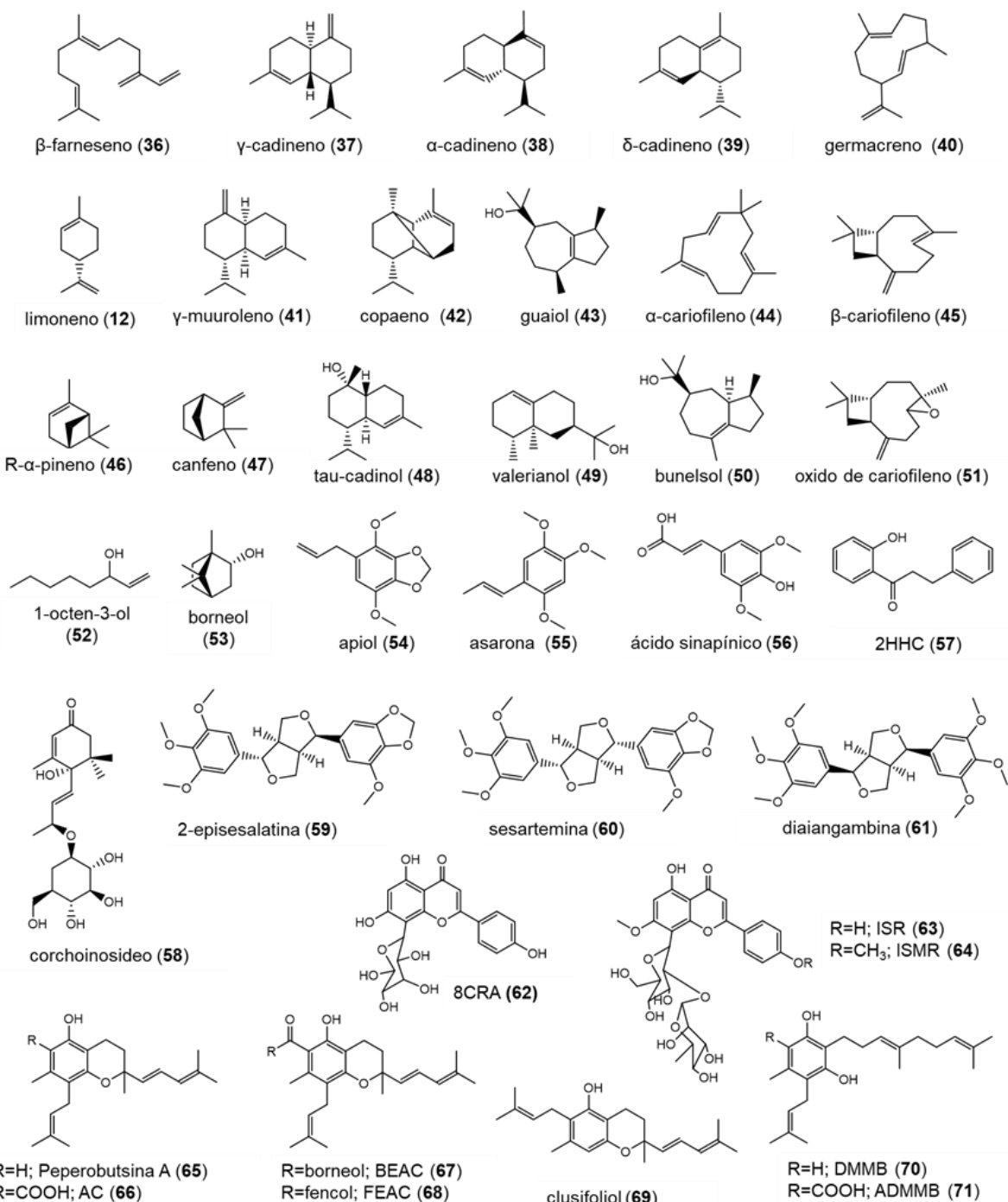
Os terpenos (**36-53**), fenilpropanóides (**54,55**) e meroterpenos e (**65-71**) são os MSs mais representativos no perfil metabolômico dessa espécie, seguido de lignanas (**59-61**), Substâncias glicosiladas (**58,62-64**) e benzopiranos (**62-69**) (ILYAS et al., 2014; RUIZ MOSTACERO et al., 2019; TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998).

Como já mencionado anteriormente (Figura 2 do tópico 1.1., pag. 25) os terpenos são oriundos da via dos isoprenóides enquanto que os meroterpenos envolvem mais de uma via, sendo que nessa espécie, as vias dos isoprenóides e a dos flavonóides estão envolvidas (ISAH et al., 2018).

Nesse contexto, tanto os flavonóides **62-64**, como os benzopiranos **65-69** são predominantemente acumulados em *P. obtusifolia*. (BATISTA et al., 2017b; RAN; LI, 2021). Entre os benzopiranos, destacam-se os cromanos peperobutsina A (**65**), ácido cromano (AC) (**66**), cromanos ésteres de borneol (BEAC) (**67**) e de fenchol (FEAC) (**68**), e o cromano clusifoliol (**69**), todos com muitos relatos de atividades biológicas importantes: tripanocida, antibacteriana, antitumoral e antioxidante (BATISTA et al., 2017b; BATISTA JR et al., 2009; FINATO et al., 2018; MOSTACERO et al., 2019).

Figura 13 - Diversidade de substâncias acumuladas em *Peperomia obtusifolia*.

#2HHC: 2'-hidroxiidrochalcona; 8CRA: 8-C-raminosil apigenina; ISMR: isosvertisin-4'-metil-eter-2'' α -L-ramnosídeo; ISR : Isoswertisin-2'' α -L-ramnosídeo; AC: ácido (E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxílico; BEAC: borneol(E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxilato; FEAC: fencol(E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxilato; DMMB: (E)-2-(4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il)-5-metil-4-(3-metilbut-2-en-1-il)benzeno-1,3-diol; ADMMB: ácido (E)-3-(4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il)-2,4-dihidroxi-6-metil-5-(3-metilbut-2-en-1-il)benzóico.



Fonte: Adpatado de Tanala, Asai e Iinuma (1998), Batista Jr. et al (2009), Ilyas et al (2014), Batista et al (2019), Finato et al (2018) e Mostacero et al (2019).

1.2.2. Ácido orselínico e a via biosintética dos cromanos de *P. obtusifolia*

Os cromanos são marcadores fitoquímicos de *P. obtusifolia*, considerados raros em comparação com os benzopiranos de outras espécies do gênero (BATISTA et al., 2017b; KATO; FURLAN, 2007). Conforme a figura 14, os benzopiranos saturados são biossintetizados a partir do ácido orselínico (**28**) e do orcinol (**28'**) e unidades prenila (BATISTA et al., 2017b). No entanto, o ácido orselínico não é comumente encontrado em plantas, mas em espécies de fungos endofíticos. (BATISTA JR et al., 2009).

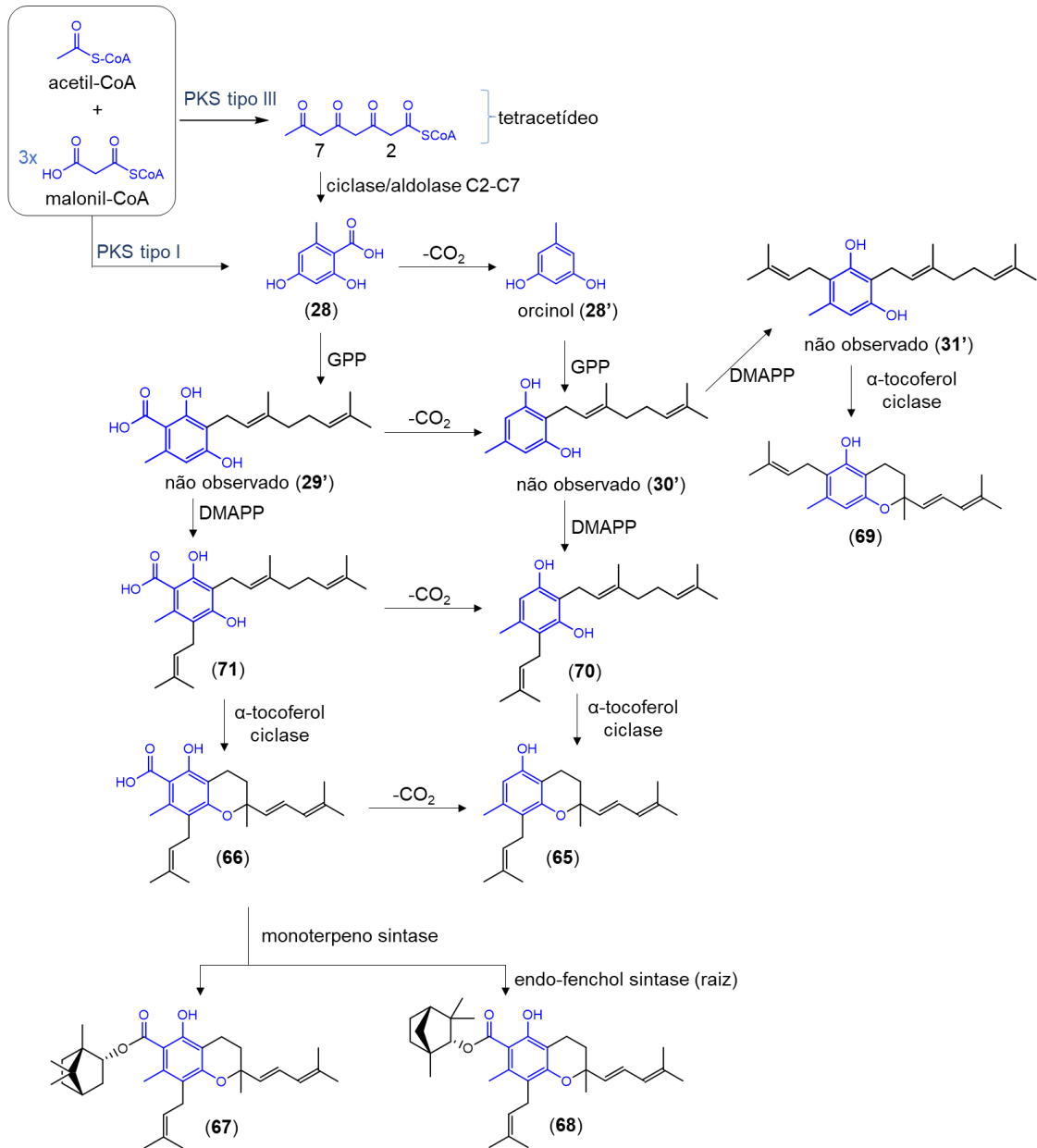
De acordo com a literatura, a via dos cromanos **65-71** está relacionada com a biossíntese dos precursores **28** e **28'**. Em estudos anteriores sobre investigação metabolômica, intermediários meroterpenos **29'** e **30'** foram identificados como derivados biossintéticos diretos de policetídeos aromáticos (BATISTA et al., 2017b).

No entanto, embora tenham sido identificados e até isolados boa parte dessas substâncias, alguns desses intermediários ainda não foram isolados e caracterizados nessa planta, entre eles o suposto precursor **28** e meroterpenos **28'-30'**. Muito provavelmente esses intermediários não são suficientemente acumulados para serem quantitativamente isoláveis, detectáveis ou até mesmo são instáveis demais (BATISTA JR et al., 2009).

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa empregando ferramentas transcriptoma e proteômica identificaram as prenil transferases difosfato de dimetilalila (DMAPP), difosfato de geranila (GPP) e α -tocoferol ciclase. Essas enzimas estão envolvidas na formação desses anéis benzopiranos, a partir do intermediário ácido orselínico (**28**) e das monoterpenos sintases na formação dos cromanos **70** e **71** (BATISTA et al., 2017b; LUO; YU; ZHOU, 2022).

No entanto, tanto o ácido orselínico (**28**), como o orcinol (**28'**) não foram identificados em *P. obtusifolia* (BATISTA JR et al., 2009). Vale ressaltar que a via do ácido orselínico envolve as PKSs do tipo I ou III, ambas comuns em plantas e fungos (GUTIERREZ et al., 2016; TAN; CLOMBURG; GONZALEZ, 2018).

Figura 14 - Rota de biossíntese de cromanos em *P. obtusifolia* a partir do intermediário ácido orselínico (28) via PKS do tipo I ou III.
 # poliketideo sintase (PKS); difosfato de dimetilalila (DMAPP); difosfato de geranila (GPP).



Fonte: Próprio autor.

Como já proposto por BATISTA et al. (2017), o ácido orselínico (28) pode ser oriundo de fungos endofíticos, visto que esses poliketídeos aromáticos são metabólitos comuns desses microrganismos.

1.3. Fungos endofíticos de *P. obtusifolia*

Os fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior de diferentes órgãos vegetais (raiz, caule, folha, frutas e sementes), mais especificamente nos espaços inter- e/ou intracelulares (RUIZ MOSTACERO et al., 2021). Todas as plantas possuem endófitos disseminados em seus tecidos constituindo um microecossistema, e boa parte deles, induzem o crescimento e a resistência sistêmica da planta hospedeira (DOMKA, AGNIESZKA MAŁGORZATA PIOTR; TURNAU, 2019; ROJAS-IDROGO; OLIVERA-MORANTE; PERÚ, 2020). Do ponto de vista evolutivo, as interações fungo-planta são resultado de anos de mutações e adaptabilidade desses seres heterólogos que desenvolveram o “compartilhamento” de processos metabólicos para absorção de nutrientes, crescimento, tolerância a estresses bióticos e abióticos, e proteção contra patógenos (ROJAS-IDROGO; OLIVERA-MORANTE; PERÚ, 2020; RUIZ MOSTACERO et al., 2021).

Por outro lado, os fungos endofíticos são prolíficos e quando cultivados na ausência do metabolismo de planta tendem a produzir diferentes MSs. As cepas fúngicas podem crescer de forma sustentável em diferentes meios de cultura de laboratório produzindo mais ou novas substâncias do que cepas de origem não endofíticas (RUIZ MOSTACERO et al., 2021).

Recentemente, diversos fungos endofíticos foram isolados de folhas de *P. obtusifolia*, com destaque para as cepas *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum* (RUIZ MOSTACERO et al., 2021).

Portanto, as espécies *D. infecunda* e *F. oxysporum* foram selecionadas para os estudos de dinâmica metabólica entre planta-fungo endofítico de forma a contribuir para a elucidação da via metabólica dos cromanos de *P. obtusifolia*. Como já mencionado, esses ascomicetos são conhecidos por produzirem e acumular inúmeras substâncias relacionadas com as vias PKSs, incluindo os policetídeos aromáticos.

1.3.1. *Diaporthe infecunda*

As espécies do gênero *Diaporthe* (Diaporthaceae) pertencem à ordem Diaporthales e à classe Dothideomycetes (CHEPKIRUI; STADLER, 2017). Estima-se que mais de 860 espécies do gênero são capazes de colonizar diversos hospedeiros de plantas como oportunistas, e que várias espécies diferentes podem até concorrer com outras espécies de gêneros diferentes no mesmo hospedeiro (GOMES et al., 2013). No entanto, algumas espécies de *Diaporthe* podem ser endófitos ou patógenos específicos, dependendo do hospedeiro, por exemplo o *D. phaseolorum* que é patogênico em *Glycine max* (soja), mas endófito em *Laguncularia racemosa* (manguezal) (GOMES et al., 2013).

As espécies de *Diaporthe*, incluindo seu estado assexuado, são classificadas e identificadas em relação ao hospedeiro específico vegetal (ROSSMAN; FARR; CASTLEBURY, 2007). No entanto, algumas espécies desse gênero podem alternar as formas sexuais de *Diaporthe* para *Phomopsis* ou vice versa. Além disso, essa alternância de sexualidade tende a resultar na diversificação de biossíntese e acúmulo de metabólitos secundários nos micélios fungicos (CHEPKIRUI; STADLER, 2017).

Atualmente, poucas informações sobre espécies específicas de *Diaporthe* estão disponíveis e confiáveis, inclusive sobre o endófito *D. infecunda* isolado de *P. obtusifolia* (GOMES et al., 2013; RUIZ MOSTACERO et al., 2021). Apesar disso, diversas espécies de *Diaporthe* isoladas de planta e cultivadas em laboratórios são relatados como produtores de PKSs, e conseqüentemente policetídeos aromáticos (CHEPKIRUI; STADLER, 2017; GOMES et al., 2013).

1.3.2. *Fusarium oxysporum*

As espécies do gênero *Fusarium* (Nectriaceae) também possuem algumas particularidades, assim como as espécies do gênero *Diaporthe*, pertencem a um vasto grupo de ascomicetos patogênicos, endófitos e sapróbios (CHEPKIRUI; STADLER, 2017; WEI; WU, 2020).

Quase todas as espécies de *Fusarium* são patógenas de plantas e animais devido sua grande capacidade de produção de toxinas (GORDON, 2017; LUZ et al., 2017). No entanto, um pequeno grupo dessas espécies são tipicamente endofíticos e possuem variantes de mesma espécie denominados de “*Formae Speciales*”, mas ainda pouco explorado (EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019).

Dessa forma, o cultivo de espécie *F. oxysporum* extraído de uma planta hospedeira tende a produzir um perfil de metabólitos secundários específicos quando comparados com a mesma espécie oriundo de outras plantas hospedeiras (EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019; JANGIR et al., 2021; WEI; WU, 2020). Outrossim, a espécie *F. oxysporum* possui uma variabilidade maior de acúmulo de policetídeos aromáticos em relação a espécie *D. infecunda* (HANSEN et al., 2015; SHARMA; MARQUES, 2018; WEI; WU, 2020).

1.4. Dinâmica metabólica

As plantas são organismos sésseis e para compensar o fato de não serem capazes de se locomover quando desafiadas por condições de crescimento desfavoráveis, ataque de pragas ou herbívoros, desenvolveram a sua sobrevivência frente à adaptabilidade ao estresse e à dinâmica biosintética de metabólitos secundários (KATO; FURLAN, 2007; KNUDSEN et al., 2018).

Em termos evolutivos, as plantas desenvolveram plasticidade metabólica com capacidade de síntese, sob demanda, de uma infinidade de fitoquímicos para responder especificamente aos desafios que surgem durante a ontogenia das plantas (KNUDSEN et al., 2018).

No caso de *P. obtusifolia*, poucos estudos foram realizados sobre a sua dinâmica metabólica. Dentre eles, são relatados a variabilidade de produção e acúmulo de pigmentos vermelhos, verdes, azuis em folhas de acordo com a quantidade de luminosidade recebida, sendo que, em condições de baixa luminosidade, a concentração de clorofila, nitrogênio e fósforo tendem a ser maiores (GARCIA-CAPARRÓS et al., 2018). De certo modo, essa dinâmica está fortemente associada com a via dos isoprenóides e com o metabolismo ácido das crassuláceas conforme discutido anteriormente (Tópico 1.2) (BATISTA et al., 2017b)

Como já mencionado, não há indícios de vias biossintéticas do ácido orselínico em plantas (BATISTA et al., 2017b; GUTIERREZ et al., 2016). Nesse contexto, o estudo metabolômico dos fungos endofíticos de *P. obtusifolia* pode auxiliar na descoberta da origem da via do ácido orselínico com base nas evidências de acúmulo dos policetídeos aromáticos existentes em espécies do gênero *Diaporthe* e *Fusarium*. (CHEPKIRUI; STADLER, 2017; HANSEN et al., 2015; WEI; WU, 2020).

Assim, o estudo metabolômico das cepas *D. infecunda* e *F. oxysporum* isoladas de *P. obtusifolia* pode nos fornecer informações valiosas sobre a origem do ácido orselínico (**28**) e/ou orcinol (**28'**). No entanto vale ressaltar que uma vez que o metabolismo fúngico está intimamente relacionado com o estado de crescimento e a forma de desenvolvimento do microrganismo, o acúmulo e a produção de MSs pode variar ao longo do tempo. (TRIASTUTI et al., 2021).

5. Conclusão

O presente trabalho teve como principal foco contribuir com a proposta de que o precursor ácido orselínico envolvido na rota biossintética dos cromanos em *Peperomia obtusifolia*, é oriundo de fungos endofíticos uma vez que a via metabólica nesses microrganismos que ainda não foi descrita em espécies de plantas.

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu estudos proteômicos e transcriptômicos (BATISTA et al., 2017a, 2017b; BATISTA JR et al., 2009; FINATO et al., 2018; KATO; FURLAN, 2007; RUIZ MOSTACERO et al., 2019; SOUZA et al., 2019) que corroboram nessa proposta. Desta forma, os endófitos de *P. obtusifolia*, *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum*, foram investigados quanto ao seu perfil metabólico, por análises de UPLC-ESI-QTOF-MS e processamento de dados de MS para anotação e estudo da composição dos policetídeos. Após estudos cromatográficos, acoplados a espectrometria de massas, apenas *F. oxysporum* apresentou perfil metabólico aderente a biossíntese de policetídeos aromáticos, diretamente relacionados com a via do ácido orselínico. Dentre os metabólitos detectados, a bicaverina, marcador biossintético dessa cepa e resultante da PKS4, que é uma policetídeo sintase relacionada corroborou o possível acúmulo do ácido orselínico em *F. oxysporum*.

A realização do planejamento experimental composto central rotacional de cultivo do *F. oxysporum*, em diferentes temperaturas e tempos de crescimento, permitiu analisar a composição química dos extratos com maior amplitude e acurácia. Tendo como foco a detecção do ácido orselínico, análises por HPLC-DAD e uso de padrão comercial para quantificação, mostrou a presença desse metabólito chave. As melhores condições para a detecção do ácido orselínico nos extratos, centraram especialmente na sua pré-concentração, empregando extração de fase sólida. Os teores de ácido orselínico, foram determinados nas seguintes condições de cultivo: tempo de 9,6 dias e temperatura de 26,8 °C. Além disso, os extratos foram avaliados por HPLC-ESI-QTOF-MS para aquisição de mais dados de MS e submetidos ao sistemas de anotações do UNIFI, métodos *in silico* de anotações da plataforma GNPS e método de acesso de base de dados online KEGG do software

MZmine2 para anotações de metabólitos, destacando-se as micotoxinas da via dos zearalenóis e zearalenonas, tetraidroxinaftalenos e ésteres de ácido orselínico.

A condição ótima de cultivo de *F. oxysporum* permitiu obter extratos brutos menos complexos. No método proposto de HPLC-DAD, o extrato foi submetido à pré-concentração de fase sólida seguido de avaliação de estabilidade no período de 24 horas o que foi constatado um aumento significativo do teor de ácido orselínico de 0,0048% para 0,0078%, correspondentes às concentrações de $24 \cdot 10^{-5}$ mg.mL⁻¹ e $39 \cdot 10^{-5}$ mg.mL⁻¹. Embora essas concentrações ainda tenham se mostrado baixas, na ordem de ppm, foi finalmente possível obter o espectro de MS/MS pela análise por UPLC-ESI-TOF-MS do extrato de cultivo otimizado correspondente ao mesmo padrão de fragmentação do espectro do padrão comercial ácido orselínico no modo ESI(-).

Por fim, os resultados apresentados e discutidos neste trabalho reforçam a presença do ácido orselínico, proveniente do *F. oxysporum*, como possível fonte heteróloga no metabolismo de *P. obtusifolia*, corroborando assim os estudos proteômicos e transcriptômicos previamente desenvolvidos (BATISTA et al., 2017a, 2017b; BATISTA JR et al., 2009; FINATO et al., 2018; KATO; FURLAN, 2007; RUIZ MOSTACERO et al., 2019; SOUZA et al., 2019). Nesse sentido, ressalta-se a importância também do estudo dos demais policetídeos aromáticos e suas PKSs relacionadas, pois o ácido orselínico pode ser também intermediário ou subproduto de diferentes PKSs.

Assim, o nosso grupo de pesquisa avançou na proposta de interação mutualista para biossintetizar os cromanos de *Peperomia obtusifolia*, cuja relação interespecífica deve ser bastante harmônica como a natureza e seu papel na vida humana.

6. REFERÊNCIAS

AAMIR, M.; SINGH, V. K.; DUBEY, M. K.; MEENA, M. In silico Prediction, Characterization, Molecular Docking, and Dynamic Studies on Fungal SDRs as Novel Targets for Searching Potential Fungicides Against *Fusarium Wilt* in Tomato. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1–28, October, 2018.

ABDEL-RAZEK, A. S.; EL-NAGGAR, M. E.; ALLAM, A.; MORSY, O. M.; OTHMAN, S. I. Microbial natural products in drug discovery. **Processes**, v. 8, n. 4, p. 1–19, 2020.

ADHIKARI, K.; LO, I. W.; CHEN, C. L.; WANG, Y. L.; LIN, K. H.; ZADEH, S. M.; RATTINAM, R.; LI, Y. S.; WU, C. J.; LI, T. L. Chemoenzymatic synthesis and biological evaluation for bioactive molecules derived from bacterial benzoyl coenzyme a ligase and plant type III polyketide synthase. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 738, 2020.

ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D. G.; LIGHTFOOT, D. A. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p.42, 2017.

BATISTA JR, O. M.; NOELI, S.; DA, J.; MOTA, S.; DA, V.; BOLZANI, S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Resolution and Absolute Configuration Assignment of a Natural Racemic Chromane from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry**, v. 21, n. 9, p. 799–801, 2009.

BATISTA, A. N. L.; SANTOS-PINTO, J. R. A. Dos; BATISTA, J. M.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; SANTONI, M. M.; ZANELLI, C. F.; KATO, M. J.; LÓPEZ, S. N.; PALMA, M. S.; FURLAN, M. The Combined Use of Proteomics and Transcriptomics Reveals a Complex Secondary Metabolite Network in *Peperomia obtusifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 5, p. 1275–1286, 2017. b.

BATISTA, A.; BATISTA JR., J.; SOUZA-MOREIRA, T.; VALENTINI, S.; KATO, M.; ZANELLI, C.; FURLAN, M. Biosynthetic Insights into p-Hydroxybenzoic Acid-Derived Benzopyrans in *Piper gaudichaudianum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 00, p. 1107–1114, 2017. a.

BECKER, K.; KUHNERT, E.; COX, R. J.; SURUP, F. Azaphilone pigments from *Hypoxylon rubiginosum* and *H. texense*: absolute configuration, bioactivity, and biosynthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2021, n. 36, p. 5094-5103, 2021.

BORNSCHEUER, U. T.; YI, D.; BAYER, T.; BADENHORST, C. P. S.; WU, S. Recent trends in biocatalysis. **Chem Soc Rev**, v. 50, n. 14, p. 7883–8346, 2021.

BORUTA, T.; BIZUKOJC, M. Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3009–3022, 2016.

BOURAS, N.; STRELKOV, S. E. The anthraquinone catenarin is phytotoxic and produced in leaves and kernels of wheat infected by *Pyrenophora tritici-repentis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n. June 2020, 2008.

BREITLING, R.; TAKANO, E. Synthetic biology advances for pharmaceutical production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 35, p. 46–51, 2015.

CHATZIVASILEIOU, A. O.; WARD, V.; EDGAR, S. M.; STEPHANOPOULOS, G. Two-step pathway for isoprenoid synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 2, p. 506–511, 2019.

CHEPKIRUI, C.; STADLER, M. The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. **Mycological Progress**, v. 16, n. 5, p. 477–494, 2017.

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29–37, 2019.

COX, R. J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, n. 13, p. 2010, 2007.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRAWFORD, J. M.; CRAIG, A. T. New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 12, p. 879–889, 2010.

CROTEAU, R.; DAVIS, E. M.; HARTMANN, T. HEMSCHEIDT, T.; SANZ-CERVERA, J. F.; SHEN, B.; WILLIAMS, R. M. **Biosynthesis: aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids**. Springer, 2003.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.

DOMKA, A. M.; ROZPAADEK, P.; TURNAU, K. Are Fungal Endophytes Merely Mycorrhizal Copycats? The Role of Fungal Endophytes in the Adaptation of Plants to Metal Toxicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. March, 2019.

EDEL-HERMANN, V.; LECOMTE, C. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. **Phytopathology**, v. 109, n. 4, p. 512–530, 2019.

ERNST, M.; KANG, K. Bin; NOTHIAS, L.; WANDY, J.; CHEN, C.; WANG, M.; ROGERS, S.; MEDEMA, M. H.; DORRESTEIN, P. C.; HOOFT, J. J. J. Van Der. MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools. **Metabolites**, v.9, n.7, p. 144, 2019.

FÄSEKE, V. C.; RAPS, F. C.; SPARR, C. Polyketide Cyclizations for the Synthesis of Polyaromatics. **Angewandte Chemie**, v. 59, n. 18, p. 6975–6983, 2020.

FINATO, A. C. et al. Biosynthetic Insights into. **Vibrational Spectroscopy**, v. 80, n. 1, p. 136–140, 2018.

GARCIA-CAPARRÓS, P.; GONZ, O.; CALATRAVA, R.; URBANO, D. S.; MAR, R.; URBANO, D. S. Types of Shelter and Covering Materials Influencing Growth, Pigment, and Nutrient Concentrations of Baby Rubber Plants (*Peperomia obtusifolia*). **HortScience**, v. 53, n. 10, p. 1434–1440, 2018.

GIBEAUT, D. M.; THOMSON, W. W. Leaf ultrastructure of *Peperomia obtusifolia*, *P. Camptotricha*, and *P. Scandens*. **Botanical Gazette**, v. 150, n. 2, p. 108–114, 1989.

GOMES, R. R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S. I. R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 31, p. 1–41, 2013.

GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 23–39, 2017.

GRIFFITHS, S. A.; COX, R. J.; OVERDIJK, E. J. R.; MESARICH, C. H.; SACCOMANNO, B.; LAZARUS, C. M.; WIT, P. J. G. M. De. Assignment of a dubious gene cluster to melanin biosynthesis in the tomato fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. **PLoS One**, p. 1–18, 2018.

GUTIERREZ, Y. V.; YAMAGUCHI, L. F.; DE MORAES, M. M.; JEFFREY, C. S.; KATO, M. J. Natural products from *Peperomia*: occurrence, biogenesis and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 6, p. 1009–1033, 2016.

HALLE, M. B.; LEE, W.; YUDHISTIRA, T.; KIM, M.; CHURCHILL, D. G. Mycophenolic acid: Biogenesis, compound isolation, biological activity, and historical advances in total synthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2019, n. 13, p. 2315-2334, 2019..

HANSEN, F. T.; GARDINER, D. M.; LYSØE, E.; ROMANS, P.; TUDZYNSKI, B.; WIEMANN, P.; ESBEN, T.; GIESE, H.; BRODERSEN, D. E.; LAURIDS, J. An update to polyketide synthase and non-ribosomal synthetase genes and nomenclature in *Fusarium*. **Fungal genetics and biology**, v. 75, p. 20–29, 2015.

HLEBA, L.; CÍSAROVÁ, M.; SHARIATI, M. A.; TANČINOVÁ, D.; LUKÁŠ, I.; PH, D. Detection of mycotoxins using MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 181-185, 2021.

ILYAS, S.; NAZ, S.; ASLAM, F.; PARVEEN, Z.; ALI, A. Chemical composition of essential oil from in vitro grown *Peperomia obtusifolia* through GC-MS. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 2, p. 667–672, 2014.

ISAH, T.; UMAR, S.; MUJIB, A.; PRASAD, M. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures : strategies , approaches , and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 132, n. 2, p. 239–265, 2018.

JAN, R.; ASAF, S.; NUMAN, M.; LUBNA; KIM, K. M. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 1–31, 2021.

JANGIR, P.; MEHRA, N.; SHARMA, K.; SINGH, N.; RANI, M. Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 1–17, 2021.

JØRGENSEN, S. H., FRANDBSEN, R. J. N., NIELSEN, K. F., LYSØE, E., SONDERGAARD, T. E., WIMMER, R., ... & SØRENSEN, J. L. *Fusarium graminearum* PKS14 is involved in orsellinic acid and orcinol synthesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 70, p. 24-31, 2014.

KAHLERT, L.; VILLANUEVA, M.; COX, R. J.; SKELLAM, E. J. Biosynthesis of 6-Hydroxymellein Requires a Collaborating Polyketide Synthase-like Enzyme. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 60, n. 20, p. 11423–11429, 2021.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and applied chemistry** v. 79, n. 4, p. 529–538, 2007.

KLAS, K. R.; KATO, H.; FRISVAD, J. C.; YU, F.; NEWMISTER, S. A.; FRALEY, A. E.; SHERMAN, D. H.; WILLIAMS, R. M. Structural and stereochemical diversity in prenylated indole alkaloids containing the bicyclo terrestrial fungi. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 6, p. 532–558, 2018.

KNUDSEN, C.; GALLAGE, N. J.; HANSEN, C. C.; MØLLER, B. L.; LAURSEN, T. Dynamic metabolic solutions to the sessile life style of plants. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 11, 2018.

KO, S. C.; LEE, H. J.; CHOI, S. Y.; CHOI, J. II; WOO, H. M. Bio-solar cell factories for photosynthetic isoprenoids production. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 181–193, 2019.

KORNFUEHRER, T.; EUSTÁQUIO, A. S. Diversification of polyketide structures: Via synthase engineering. **MedChemComm**, v. 10, n. 8, p. 1256–1272, 2019.

LAGASHETTI, A. C.; DUFOSS, L.; SINGH, S. K.; SINGH, P. N. Fungal Pigments and Their Prospects in different Industries. **Microorganisms**, v.7, n. 12, p. 604, 2019.

LATA, R.; CHOWDHURY, S.; GOND, S. K.; JR, J. F. W. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 4, 2018.

LEBEAU, J.; PETIT, T.; DUFOSSÉ, L.; CARO, Y. Putative metabolic pathway for the bioproduction of bikaverin and intermediates thereof in the wild *Fusarium oxysporum* LCP531 strain. **AMB Express**, v.9, n.1, 2019.

LI, L.; JIANG, W.; LU, Y. New strategies and approaches for engineering biosynthetic gene clusters of microbial natural products. **Biotechnology Advances**, v. 35, p. 936–949, 2017.

LUO, F.; YU, Z.; ZHOU, Q. Multi-Omics-Based Discovery of Plant Signaling Molecules. **Metabolites**, v. 12, n. 1, 2022.

LUZ, C.; SALADINO, F.; LUCIANO, F. B.; MAÑES, J.; MECA, G. Occurrence, toxicity, bioaccessibility and mitigation strategies of beauvericin, a minor *Fusarium* mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 430–439, 2017.

MÅNSSON, M. Discovery of bioactive natural products from marine bacteria. **Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark**, 2011.

MASI, M.; ALOI, F.; NOCERA, P.; CACCIOLA, S. O.; SURICO, G.; EVIDENTE, A. Phytotoxic metabolites isolated from *Neufusicoccum batangarum*, the causal agent of the scabby canker of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 126, 2020.

MASI, M.; MADDAU, L.; LINALDEDDU, B. T.; SCANU, B.; EVIDENTE, A.; CIMMINO, A. Bioactive Metabolites from Pathogenic and Endophytic Fungi of Forest Trees. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 208–252, 2018.

MORISHITA, Y.; OKAZAKI, Y.; LUO, Y. Y.; NUNOKI, J.; TANIGUCHI, T.; OSHIMA, Y.; ASAI, T. Use of plant hormones to activate silent polyketide biosynthetic pathways in *Arthrinium sacchari*, a fungus isolated from a spider. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 17, p. 780–784, 2019.

MOSTACERO, N. R.; CASTELLI, M. V.; CUTRÓ, A. C.; MARCOS, J.; JR, B.; FURLAN, M.; VALLES, J.; LUISA, C.; LÓPEZ, S. N.; RUIZ, N.; CASTELLI, M. V.; CUTRÓ, A. C.; MARCOS, J.; JR, B.; FURLAN, M.; VALLES, J.; FULGUEIRA, C. L.; PIPERACEAE, P.; HOLLMANN, A. Antibacterial activity of prenylated benzopyrans from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Natural Product Research**, v.35, n.10, 2021.

MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; LEITE, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, M. C. M. Isoswertisin flavones and

other constituents from *Peperomia obtusifolia*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2011.

NEWMAN, A. G.; VAGSTAD, A. L.; STORM, P. A.; TOWNSEND, C. A. Systematic domain swaps of iterative, nonreducing polyketide synthases provide a mechanistic understanding and rationale for catalytic reprogramming. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 20, p. 7348–7362, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 2020.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n. 1–2, p. 111–136, 2003.

NOBLE, C.; LINNET, K. Application of a screening method for fentanyl and its analogues using UHPLC - QTOF - MS with data - independent acquisition (DIA) in MS E mode and retrospective analysis of authentic forensic blood samples. **Drug Testing and Analysis**, v. 10, n. 4, p. 651–662, 2018.

PADDON, C. J.; KEASLING, J. D. Semi-synthetic artemisinin: A model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 355–367, 2014.

PAULO, B. S.; SIGRIST, R.; DE OLIVEIRA, L. G. AVANÇOS RECENTES EM BISSÍNTESE COMBINATÓRIA DE POLICETÍDEOS: PERSPECTIVAS E DESAFIOS. **Quimica Nova**, v. 42, n. 1, p. 71–83, 2019.

PILON, A. C.; GU, H.; RAFTERY, D.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; CARNEVALE NETO, F. Mass Spectral Similarity Networking and Gas-Phase Fragmentation Reactions in the Structural Analysis of Flavonoid Glycoconjugates. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 16, p. 10413–10423, 2019.

PLAXTON, W. C. THE ORGANIZATION AND REGULATION OF PLANT GLYCOLYSIS. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 185–214, 1996.

RAN, H.; LI, S. Fungal benzene carbaldehydes: occurrence, structural diversity, activities and biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 1, p. 240–263, 2021.

ROJAS-IDROGO, C.; OLIVERA-MORANTE, M. I.; PERÚ, L. In vitro propagation of *Peperomia albovittata* and *Peperomia galioides* by organogenesis. **Biotechnologia Vegetal**, v. 20, n. 2, p. 92–103, 2020.

ROKAS, A.; MEAD, M. E.; STEENWYK, J. L.; RAJA, H. A.; OBERLIES, N. H. Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity. **Natural Product Reports**, v. 37, n. 7, p. 868–878, 2020.

ROSSMAN, A. Y.; FARR, D. F.; CASTLEBURY, L. A. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. **Mycoscience**, v. 48, n. 3, p. 135–144, 2007.

RUIZ MOSTACERO, N.; CASTELLI, M. V.; BAROLO, M. I.; AMIGOT, S. L.; FULGUEIRA, C. L.; LÓPEZ, S. N. Fungal endophytes in *Peperomia obtusifolia* and their potential as inhibitors of chickpea fungal pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 1–16, 2021.

RUIZ MOSTACERO, N.; CASTELLI, M. V.; CUTRÓ, A. C.; HOLLMANN, A.; BATISTA, J. M.; FURLAN, M.; VALLES, J.; FULGUEIRA, C. L.; LÓPEZ, S. N. Antibacterial activity of prenylated benzopyrans from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Natural Product Research**, v. 35, n. 10, 2021.

SAYED, A. M.; ABDEL-WAHAB, N. M.; HASSAN, H. M.; ABDELMOHSEN, U. R. *Saccharopolyspora*: an underexplored source for bioactive natural products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 314–329, 2020.

SHARMA, L.; MARQUES, G. *Fusarium*, an Entomopathogen — A Myth or Reality? . **Pathogens**, v. 7, n. 4, p. 93, 2018.

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297–1300, 2015.

SHIMIZU, Y.; OGATA, H.; GOTO, S. Type III Polyketide Synthases: Functional Classification and Phylogenomics. **ChemBioChem**, v. 18, n. 1, p. 50–65, 2017.

SONG, H.; WU, H.; GENG, Z.; SUN, C.; REN, S. and 9 , 10 , 13-THODE in Cured Meat Products by LC-MS / MS. **Food Analytical Methods**, p. 2832–2841, 2016.

SOUZA, A. A.; VESSECCHI, R.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M. Combined use of tandem mass spectrometry and computational chemistry to study 2H-chromenes from *Piper aduncum*. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 54, n. 7, p. 634–642, 2019.

TAN, Y.; CHANG, S. K. C. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. **Food Chemistry**, v. 242, p. 147–155, 2018.

TAN, Z.; CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Synthetic Pathway for the Production of Olivetolic Acid in *Escherichia coli*. **ACS Synthetic Biology**, v.7, n.8, 2018.

TANAKA, T.; ASAI, F.; IINUMA, M. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 229–232, 1998.

THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; ID, A. M.; DZOBO, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences Review**, v. 19, n. 1578, p. 29, 2018.

TRIASTUTI, A.; HADDAD, M.; BARAKAT, F.; MEJIA, K.; RABOUILLE, G.; DEV, U. M. R. P.; TOULOUSE, U. De. Dynamics of Chemical Diversity during Co-Cultures : An Integrative Time-Scale Metabolomics Study of Fungal Endophytes *Cophiniforma mamane* and *Fusarium solani*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 2, 2021.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1217–1220, 2011.

VASILEIADOU, A.; KARAPANAGIOTIS, I.; ZOTOU, A. Development and validation of a liquid chromatographic method with diode array detection for the determination of anthraquinones, flavonoids and other natural dyes in aged silk. **Journal of Chromatography A**, v. 1651, p. 462312, 2021.

VIEIRA, N. C.; CORTELO, P. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Rapid qualitative profiling of metabolites present in *Fusarium solani*, a rhizospheric fungus derived from *Senna spectabilis*, using GC/MS and UPLC-QTOF/MSE techniques assisted by UNIFI information system. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 26, n. 4, p. 281–291, 2020.

WANG, J.; LIU, S.; SONG, Z.; XU, T.; LIU, C. Naturally Occurring Flavonoids and Isoflavonoids and Their Microbial Transformation: A Review. **Molecules**, v. 25, n. 21, 2020. a.

WANG, J.; ZHANG, R.; CHEN, X.; SUN, X.; YAN, Y.; SHEN, X.; YUAN, Q. Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2020. b.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; BANDEIRA, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WEI, J.; WU, B. Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus *Fusarium*. **Fitoterapia**, v.146, p. 104638, 2020.

YAN, L.; ZHU, J.; ZHAO, X.; SHI, J.; JIANG, C.; SHAO, D. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, 2019.

YANG, X.; WEI, S.; LIU, B.; GUO, D.; ZHENG, B.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; LUO, L.; HUANG, D. A novel integrated non-targeted metabolomic analysis reveals significant metabolite variations between different lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties. **Horticulture Research**, p. 1–14, 2018

ZHANG, H.; RUAN, C.; BAI, X.; ZHANG, M.; ZHU, S.; JIANG, Y. Isolation and identification of the antimicrobial agent beauvericin from the endophytic *Fusarium*

oxysporum 5-19 with NMR and ESI-MS/MS. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–5, 2016.